

316081-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
첨단생산기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003117-01

농산물
원산지
판별을
위한
대사체
지문
활용
플랫폼
기술
개발

최종
보고서

2020

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문 활용 플랫폼 기술 개발

최종보고서

2020 . 07 . 06.

주관연구기관 / 이화여자대학교
협동연구기관 / 송실대학교
위탁연구기관 / 국립농산물품질관리원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문 활용 플랫폼 기술 개발”(개발기간 : 2016 . 09. 05 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . . .

주관연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단 (대표자) 반 효 경 (인)

협동연구기관명 : 숭실대학교 산학협력단 (대표자) 김 주 용 (인)

참여기관명 : 국립농산물품질관리원 (대표자) 홍 성 희 (인)

주관연구책임자 : 김 영 석

협동연구책임자 : 서 정 아

참여기관책임자 : 신 병 곤

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

1. 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 분석 방법을 확립
2. 원산지 판별 모델 수립 및 원산지 판별용 바이오마커를 발굴하여 특허 출원 하였으며 validation을 통해 모델 적합성을 확보하고 원산지 판별 정확도 100% 확보
3. 다양한 분석기기로 검출한 대사체 데이터의 통합 데이터베이스를 구축하고, pathway analysis를 통해 원산지 구별에 기여하는 pathway database를 구축
4. 원산지에 따른 농산물 대사체를 분석하고 연도별로 획득한 시료의 포괄적 연계분석을 통해 대사체 유동성 분석을 수행하고 최적화 모델을 구축
5. 원산지 특이적 요인 대사체, 연도 특이적 요인 대사체, 두 요소 간의 상호작용 대사체를 확인 및 다변량 통계분석을 통해 최종적인 바이오마커를 발굴
6. 원산지별 농산물 시료의 미생물 metagenomic 분석을 통해 차별화된 미생물 군집을 탐색하여 미생물 군집 바이오마커 후보군 확보
7. 원산지 단속 적용을 위해 원산지가 증명된 대두 시료를 이용하여 원산지 판별법을 검증하였으며 검증 정확도는 100%로 나타남
8. 기존 원산지 판별 방법인 근적외선분광분석기를 이용한 농산물 검사시간은 40분이 소요되는 반면 본 연구에서 개발한 FT-IR을 이용한 방법은 검사시간이 20분 미만으로 기존 검사시간 대비 50% 이상 감소함

보고서 면수
328

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 대사체 지문 및 미생물 군집 분석 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용 ○ 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립 : 전대사체 분석, non-targeted 분석 ○ 국내 최초 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 (농산물 3종: 대두, 참깨, 쌀) 및 네트워크 구축 : NMR, GC-MS, LC-MS 데이터 통합 지역별, 연도별 데이터 구축 및 고도화 ○ 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수(환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명 ○ 원산지 판별용 바이오마커 발굴 및 검증모델 수립 : 원산지 판별율 95% 확보 ○ 세계 최초 미생물 군집 분석데이터를 활용한 농산물 원산지 판별용 마커 발굴 ○ 국내 최초 농산물 원산지 단속에 실제 활용 : 농산물 1종 이상 ○ 구축된 데이터베이스 활용 원산지 판별 기존 검사시간 대비 50% 감소 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 분석 방법 확립 및 데이터베이스 구축 : 농산물 (대두, 참깨, 쌀) 원산지 판별을 위한 대사체 분석 방법 (전대사체 분석, non-targeted 분석)을 확립하고, 이를 활용하여 대사체를 정성 및 정량 분석하여 데이터베이스를 구축함. ○ 원산지 판별용 바이오마커 발굴 및 검증 모델 수립 : 다변량 통계분석을 통해 원산지 판별 모델 수립 및 원산지 판별용 바이오마커를 발굴하여 국내 특허 3건을 출원하였으며, validation을 통해 모델 적합성을 확인하고 원산지 판별 정확도 100%를 확보함. ○ 국내 최초 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 (농산물 3종: 대두, 참깨, 쌀) 및 네트워크 구축 : NMR, GC-MS, LC-MS 데이터 통합 : NMR, GC-MS, GC-TOF/MS, LC-MS 분석 기기를 통해 농산물 3종 (대두, 참깨, 쌀)에 대해 검출한 대사체 데이터의 통합 데이터베이스를 구축하고, pathway analysis를 통해 원산지 구별에 기여하는 pathway database를 구축함. ○ 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수 (환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명 : 원산지에 따른 농산물 대사체를 분석하고 연도별 (2015년도, 2016년도, 2017년도)로 획득한 시료의 포괄적 연계분석을 통해 대사체 유동성 분석을 수행하고 최적화 모델을 구축함. 또한, 원산지 특이적 요인 대사체, 연도 특이적 요인 대사체, 두 요소 간의 상호작용 대사체를 확인하였으며, 다변량 통계분석을 통해 최종적인 바이오마커를 발굴함. ○ 세계 최초 미생물 군집 분석데이터를 활용한 농산물 원산지 판별용 마커 발굴 : 원산지별 농산물 시료의 미생물 metagenomic 분석을 통해 차별화된 미생물 군집을 탐색하여 미생물 군집 바이오마커 후보군 확보함. ○ 국내 최초 농산물 원산지 단속에 실제 활용 : 농산물 1종 이상 : 원산지 단속 적용을 위해 원산지가 증명된 대두 시료 12점 (국내산 6점, 국외산 6점)을 이용하여 발굴된 바이오마커를 이용하여 원산지 판별법을 검증하였으며 검증 정확도는 100%로 나타남. ○ 구축된 데이터베이스 활용 원산지 판별 기존 검사시간 대비 50% 감소 : 기존 원산지 판별 방법인 근적외선분광분석기를 이용한 농산물 (대두, 참깨) 검사시간은 40분이 소요됨. 반면 본 연구에서 개발한 FT-IR을 이용한 원산지 판별 방법은 검사시간이 20분 미만으로 기존 검사시간 대비 50% 이상 감소함. 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - GC-MS, GC-TOF/MS, LC-MS, NMR, FT-IR을 이용한 대사체 지문법 확립하여 국가의 과학적 위상을 나타내고 농산물 원산지 판별 관련 추출, 분리 및 분석, 판별 기법 관련 응용 연구에 활용 가능 - 여러 분석 기기를 이용한 농산물 대사체 분석을 통해 원산지를 구별하는데 적용 가능한 바이오마커 정보를 확보하여 농산물 위변조 단속에 활용될 수 있음. - 원산지별 농산물 시료의 미생물 metagenomic 분석을 통해 차별화된 미생물 군집을 탐색하여 미생물 군집 바이오마커 후보군 확보하여 원산지 모니터링에 활용 가능함. - 농산물의 위, 변조를 방지함과 동시에 원산지를 명확하게 구별할 수 있는 분석 기술이 확립되어 국내외 농산물의 판별에 과학적, 대사체학적 근거를 확보함으로써 농산물 시장의 질서정립에 크게 기여할 것임. - 개발기술의 교육, 원산지 판별 통합 데이터베이스 제공 등을 통해 농산물 시장질서 확립과 소비자들의 신뢰 확보에 크게 기여할 것이라 기대함. 				
국문핵심어 (5개 이내)	농산물	원산지판별	대사체지문	미생물군집 분석	바이오마커
영문핵심어 (5개 이내)	agricultural products	discrimination of geographical origins	metabolomic fingerprinting	metagenomics	biomarker

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	16
2-1. 실험적, 이론적	16
2-2. 연구내용 및 연구 결과	30
2-3. 연구개발 성과	323
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	328
4. 연구결과의 활용 계획	347
붙임. 참고 문헌	350

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- ▶ 대사체 지문 및 미생물 군집 분석 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용
 - 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립 : 전대사체 분석, non-targeted 분석
 - 국내 최초 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 (농산물 3종: 대두, 참깨, 쌀) 및 네트워크 구축 : NMR, GC-MS, LC-MS 데이터 통합
 - 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수 (환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명
 - 원산지 판별용 바이오마커 발굴 및 검증모델 수립 : 원산지 판별율 95% 확보
 - 세계 최초 미생물 군집 분석데이터를 활용한 농산물 원산지 판별용 마커 발굴
 - 국내 최초 농산물 원산지 단속에 실제 활용 : 농산물 1종 이상
 - 구축된 데이터베이스 활용 원산지 판별 기존 검사시간 대비 50% 감소

1-2. 연구개발의 필요성

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 대사체학 기반 농산물 원산지 판별의 국내 기술현황

- 전 세계적인 FTA 확대와 더불어 농산물의 원산지 추적에 대한 연구가 활발해지고 있으며, 지금까지 주로 개발되어 사용되고 있는 방법으로는 동위원소분석법, 미량원소분석법, 유전자분석법, 전자코 기술 등이 있음. 그러나, 대사체학 기법을 이용한 농산물 원산지 판별 연구는 아직까지 활발히 이루어지지 않았음. 최근 국내 농산물이 중국 현지에서 재배되어 한국으로 반입되면서 유전형질 및 유전자 마커로 원산지를 감별하는 것에 대한 한계가 드러남에 따라 동일한 유전형질을 가지고 있어도 환경요인에 따라서 변하는 대사체를 분석하는 대사체학 기법이 주목받고 있음.
- 농산물 원산지판별 관련 연구과제로는 농림수산물식품부의 수산물, 돼지고기, 배추 원산지 판별과제, 농촌진흥청의 홍삼 농축액 원산지 판별 과제 등이 진행되었으나, 다양한 분석기기를 동시에 이용하여 다양한 화학적, 생물학적 특성을 가진 대사체 분석을 수행하고 DB를 구축한 사례는 거의 없음.
- 본 과제 참여 연구진들인 이화여대, 중앙대 및 국민대 연구팀은 GC-MS, GC-TOF MS, NMR 및 LC-MS 기기를 이용하여 국제 수준의 대사체 프로파일링 기술을 보유하고 있으며, 일부 천연물 및 식품 소재에 대한 대사체 프로파일링 DB를 보유하고 library를 구축하고 있음.
- 국내 대사체학의 주요 연구 분야는 천연물 대사체학 및 library 활용 천연물 신소재 개발, 대사체학을 기초로 한 기능성 천연물 신소재 발굴 및 기능성 식품, 화장품 및 천연물 유용산물 개발, 대사물질 기반 천연물 taxonomy 연구 및 이를 활용한 기능성 소재 발굴, 대사체학을 이용한 식물세포배양/생약학 연구, NMR 기반 대사체학을 이용한 생약의 원산지 판별, 품질 관리 및 GMO 평가 연구, 대사체학을 이용한 발효식품의 최적 발효조건 탐

색 연구, 포도 및 와인 대사체 연구('09 생명공학백서-생명공학정책연구센터, '08 국가 대사체 연구 추진전략-국립독성과학원) 등이 있음.

- 2007년 이후 대사체학 관련 SCI급 연구 논문 발표 횟수가 증가되고 있는 추세이나, 국내 연구진의 발표실적은 전체 실적의 4% 정도로 아직 국내 연구 수준은 대사체 연구 분야 선진국(미국, 영국, 캐나다, 독일, 일본, 네델란드 등)에 비해 낮은 수준임('09 Web of Science, 생명공학백서-생명공학정책연구센터).

2) 대사체학 기반 농산물 원산지 판별의 국내 경쟁기관 연구현황

- 국내 대사체 연구를 주도하는 주요기관들인 한국기초과학연구소, 고려대학교, 우석대학교 등에서 대사체학을 활용한 농산물 및 약용작물의 원산지 판별법을 시도한 사례가 있음. 그러나, 아직까지는 일부 품목에만 시도되었으며, 비교 대상인 원산지도 매우 제한적임. 연도별 수확기간에 따른 차이는 아직 이루어진 바 없음. 특히, 환경요인과의 상관관계 규명은 아직 심도있게 이루어진 바 없음.
- 국내 대사체학 선도 연구진들의 기술 수준은 선진국 최고 연구 수준에 상당히 근접하고 있으나, 바이오마커 발굴, 데이터 프로세싱 등의 연구에는 아직 미흡한 부분이 있음. 또한, 데이터를 의미 있는 결과로 해석하는 알고리즘, 가설 생성 및 통계처리 기술이 부족한 상황임. 특히, 농산물 원산지 판별 관련 통합적인 DB는 구축된 적이 없음.
- 전체 시스템 수준의 대사체 네트워크(Genome-wide Metabolic Network) 구성은 국제적으로도 최근 2-3년 사이에 들어서야 본격적으로 활성화되고 있음. 따라서 대사체 관련 데이터 프로세스 방법개발 및 개체별 DB 구축에 관련된 국내외 연구는 현재로서는 초기 단계이나 향후 급격히 활성화될 것으로 전망됨.
- 시스템 네트워크 모델링 기법을 적용한 대사체 프로파일 분석은 매우 초기 단계임, 특히 농산물을 대상으로 원산지별 시료로부터 통합 대사체 프로파일링을 한 사례는 전무한 실정임. 다양한 분석플랫폼을 적용한 체계적인 방법으로 대사체 정보를 원산지 판별에 반영하면, 대사체 프로파일링 간의 상관관계 규명이 가능하고, 통합적인 대사체 분석이 가능할 것으로 여겨짐.

3) 대사체학 기반 농산물 원산지 판별의 국내 지식재산권 현황

- 기존 특허는 배추, 인삼 등 특정 품목에 한정되어 있으며, 다양한 NMR, GC-MS, LC-MS 등 다양한 분석기법을 활용한 전대사체적 접근이 부족함. 그리고, 특정 지역 및 기간에 한정되어 있어 DB 활용 측면에서 한계가 있음.

4) 미생물 군집 프로파일링 관련 국내 기술 수준 및 연구 동향

- 2010년 전후로 전통 발효 식품의 고부가가치화를 위한 정부의 적극적인 R&D 지원으로 김치 발효 과정 중의 유산균(LAB)의 군집 변화와 대사산물간의 상호관계, 메주, 젓갈 등에서 DGGE와 16S rRNA 유전자 염기서열 기반의 파이로시퀀싱 기법을 이용한 미생물 군집 분석 연구 등이 중앙대 연구팀을 중심으로 활발히 진행되고 있음 (Jung et al., 2014, Lee et al., 2015) 메주 발효과정에서의 세균 및 진균류의 군집의 상관관계를 분석하였으며 (Jung et al., 2015), 최근에는 RDP 파이로시퀀싱 기법을 이용하여 된장 발효 과정 중

세균 군집과 대사산물의 상관 관계를 규명하고, 안전하고 고품질 된장 생산에 영향을 미치는 우점종의 세균 군집의 기능 특성을 규명한 연구 결과를 발표하였음 (Jung et al., 2016).

○ 경희대 연구팀은 16S rRNA 유전자 염기서열 기반의 파이로시퀀싱 기법을 이용하여 논 토양, 발효 식품, 인간의 창자, 해수 및 표면 근처의 공기 등 국내 다양한 자연 생태계를 대상으로 바이러스 군집 분석, 포유동물의 장내 메타지노믹스 연구를 통한 균형 잡힌 장 유지와 미생물 군집의 비정상적인 증가와의 상관관계 연구, 목질 섭식 곤충의 곤충 종류 및 장 부위별 장내 세균 군집 조성 및 다양성 등의 연구를 활발히 수행 중임 (Kim et al., 2013, Choi et al., 2015, Shin et al., 2015).

○ 그 외, 고려대는 공중 보건과 관련한 실내 공기 중의 세균, 진균의 미생물 군집을 분석을 통하여 보건정책 개발을 위한 기술을 제공하였으며 (Shin et al., 2015) 디젤기름에 오염된 토양의 미생물 다양성을 분석하여 생태학적인 환경 복원 관련 연구도 수행하였음 (Jung et al., 2016). 충북대 연구팀은 누룩의 미생물 군집이 발효 과정 및 맛에 영향을 미친다는 연구결과를 밀로 제조한 전통 누룩을 454 파이로시퀀싱 기법을 이용하여 진균류 (fungi)의 군집을 분석하고 과학적인 비교를 위한 표준 집종 확립을 제시하는 연구 결과를 발표하였음 (Bal et al., 2016).

5) 농산물 바이오마커 발굴 관련 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 2010년도 이후 농산물품질관리원에서 곱감, 구기자, 쌀 등의 원산지 판별을 위한 키트를 개발하여 특허를 출원 중에 있거나 등록하였으며 주로 유전체 정보를 활용한 단일염기다형성마커와 판별 프라이머 셋트 개발이 특허의 내용이었음.

○ 농촌진흥청은 주로 인삼의 중국산, 미국산, 고려인삼을 판별할 수 있는 프라이머 셋트를 개발하여 특허를 출원 중에 있음.

○ 위와 같이 현재까지는 주로 농산물 자체의 원산지 판별 및 품종 판별을 위한 단일염기다형성(SNP)을 활용한 마커 발굴이 주요한 기술개발의 내용이었으며 지금까지 바이오마커에 대한 특허 중 농산물과 밀접한 관련이 있는 미생물의 유전체 정보를 활용한 바이오마커 발굴의 대한 특허는 찾기 어려웠음.

6) 미생물 유전체정보 기반의 원산지 판별 국내 기술개발 수준 및 지식재산권 현황

○ 국내에서 메타지노믹스 정보에 의한 미생물 군집 분석으로 원산지 판별을 시도한 연구는 처음 시도하는 것으로 조사되었으며 따라서 이와 관련한 지식재산권의 현황도 찾기 어려웠음.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 대사체학 기반 농산물 원산지 판별의 국외 기술 현황

- 농산물의 원산지 판별은 주로 isotope-ratio mass spectrometry(IRMS), HPLC, visible micro-Raman spectroscopy, ultraviolet-visible absorption spectroscopy(UV-vis), elemental analysis-like inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry(ICP-AES) 등을 활용한 화학적 분석으로 이루어져 왔음. 그러나, 이들 연구방법들은 모두 특정 성분이나 그룹에 초점을 맞추어 온 targeted 접근방법이었음.
- 최근에는 대사체학의 급속한 발전으로 NMR, GC-MS, LC-MS 등의 기기분석법과 PCA, PLS-DA, HCA 등의 다변량통계기법을 활용한 non-targeted 접근방법으로 토마토(Feudo et al, 2011), 토마토 페이스트(Lo Feudo et al., 2011), 커피원두(Wei, et al., 2012), 프로폴리스(Cheng et al., 2013), 오렌지(Diaz et al., 2014), 구기자 열매(Bondia-Pons et. al., 2014) 등 다양한 농산물의 원산지 판별에 활용된 바 있음. 특히, Lo Feudo 등은 원산지 판별용 검증모델을 확립하여 94-100% 수준의 높은 적중률을 보여준다고 하였음.
- 그러나, 현재까지의 연구는 대부분 매우 제한적인 지역의 농산물에 대한 연구결과에 한정되어 있으며, 수확시기에 따른 차이 및 환경요인(기후, 토양 등)과의 상관관계 규명이 매우 미흡한 실정임.

2) 대사체학 기반 원산지 판별의 국외 연구 사례

- 오렌지 원산지에 따른 UHPLC-(Q)TOF-MS기반 대사체학 연구 (*Food Chem*, 2014, 157:84-93)
 - UHPLC-(Q)TOF-MS를 이용하여 서로 다른 원산지 (스페인, 아르헨티나, 브라질, 남아프리카)에서 재배된 오렌지의 대사체 프로파일링을 수행함.
 - Accurate MS를 활용하여 지역을 구분하는 잠재적인 마커로서 citrussin D를 밝힘.

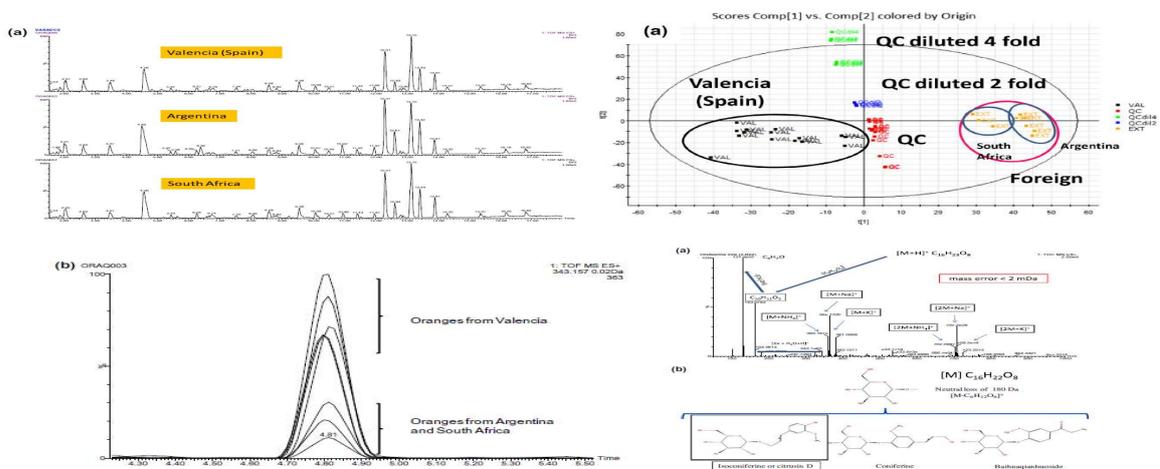


그림 1. UHPLC-(Q)TOF-MS 대사체 프로파일을 이용한 오렌지의 원산지별 구분 (*Food Chem*, 2014, 157:84-93)

○ 피스타치오 열매의 원산지에 따른 NMR 기반 대사체학 연구 (*Food Res Int*, 2014, 62:66-73)

- 1D 및 2D NMR을 이용하여 서로 다른 원산지 (시리아, 터키, 이란, 이탈리아)에서 재배되어 가공된 피스타치오의 대사체 프로파일링을 수행함.
- 48개 수용성 대사체들 (유기산, 아미노산, 탄수화물, 기타 대사체)을 정성분석하고 그 중에서 28개 대사체들의 정량분석을 수행함.

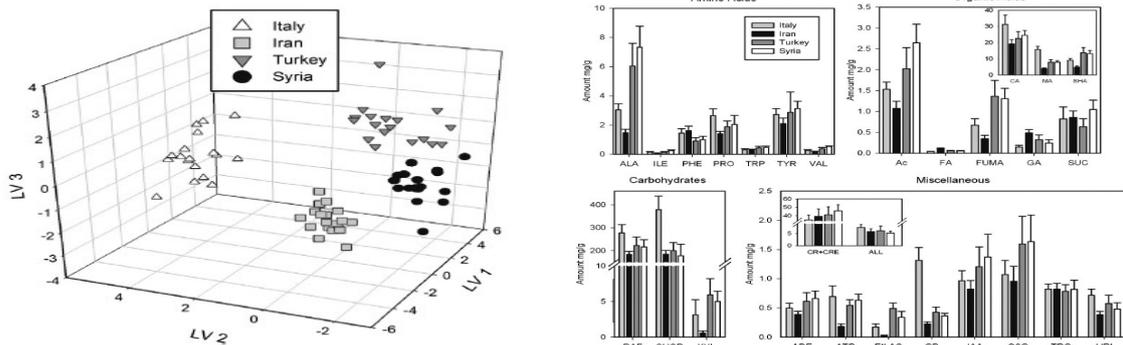


그림 2. NMR 대사체 프로파일을 이용한 피스타치오의 원산지별 구분
(*Food Res Int*, 2014, 62:66-73)

○ 커피 열매의 원산지에 따른 ^{13}C -NMR 기반 대사체학 연구 (*J Agr Food Chem*, 2012, 60:10118-10125)

- ^{13}C -NMR을 이용하여 서로 다른 원산지 (브라질, 콜롬비아, 과테말라, 탄자니아)에서 재배되어 가공된 커피 열매의 대사체 프로파일링을 수행함.
- 총 14개 대사체들 (sucrose, caffeine, chlorogenic acids, choline, amino acids, organic acids, trigonelline 등)의 프로파일을 비교 분석 함.
- 탄자니아 커피는 acetic acid, sucrose, trigonelline의 함량이 높았으며, 콜롬비아 커피는 citrate, CQAs, sucrose의 함량이 높았으며, 과테말라 커피에는 caffeine, 브라질 커피에는 아미노산이 높았음.

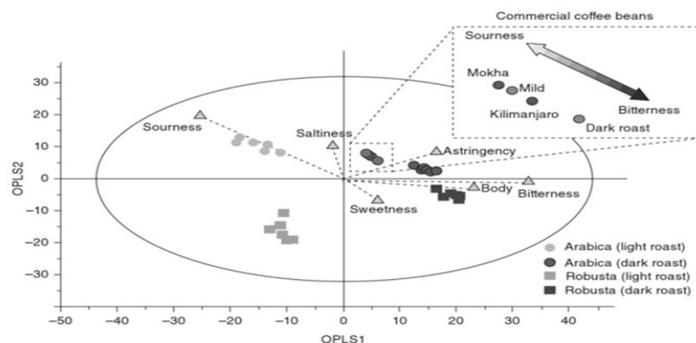
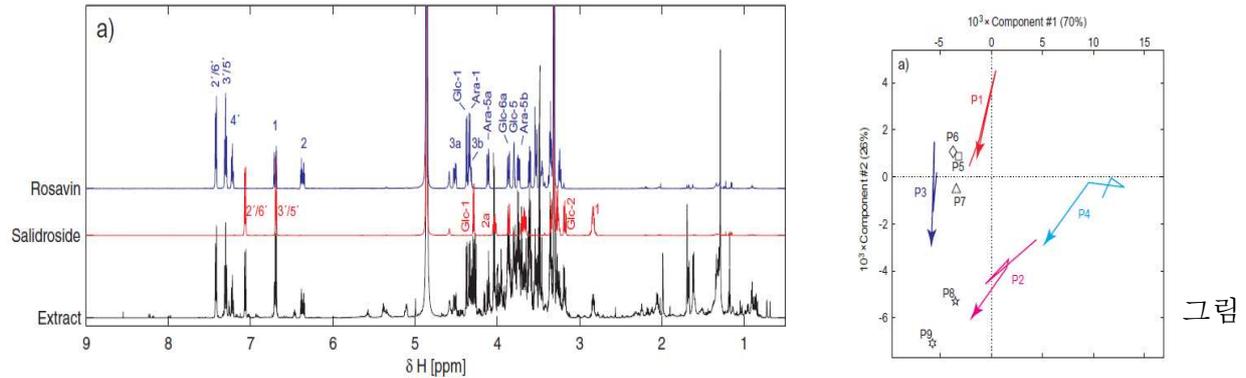


그림 3. NMR 대사체 프로파일을 이용한 커피 열매의 원산지별 구분
(*J Agr Food Chem*, 2012, 60:10118-10125)

○ 홍경천 rhizome의 원산지에 따른 $^1\text{H-NMR}$ 기반 대사체학 연구 (*Phytochem Anal*, 2011, 22:158-165)

- $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 서로 다른 원산지 (스위스 알프스, 핀란드, 시베리아 알타이 지역)에서 재배된 홍경천 rhizome의 대사체 프로파일링을 수행함.
- 방향족 대사체 중 salidroside, rosavin이 홍경천의 원산지 구분에 크게 기여함을 밝힘.



4. NMR 대사체 프로파일을 이용한 홍경천 rhizome의 원산지별 구분
(*Phytochem Anal*, 2011, 22:158-165)

○ 그 외 연구들로서 북아메리카 6개 지역에 대한 GC-MS 기반 옥수수 대사체 프로파일 비교, 아르헨티나와 이탈리아에서 생산된 레몬 오일의 UHPLC-TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$ 기반 대사체 프로파일 비교 (*Food Chem*, 2014, 150:235-245), 와인으로 대표되는 포도 유래 식품들의 지역, 품종, 생산연도 등에 따른 대사체 프로파일 (*Food Res Int*, 2013, 54:1184-1194), LC-MS 및 GC-MS 기반 고추의 품종에 따른 극성 및 휘발성 물질 프로파일 (*Metabolomics*, 2013, 9:130-144) 등이 있음. 대부분 각 국가마다 주요한 먹거리를 대상으로 대사체학 기반 원산지 판별 연구들이 진행되고 있음.

○ 그 외 연구들로서 북아메리카 6개 지역에 대한 GC-MS 기반 옥수수 대사체 프로파일 비교, 아르헨티나와 이탈리아에서 생산된 레몬 오일의 UHPLC-TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$ 기반 대사체 프로파일 비교 (*Food Chem*, 2014, 150:235-245), 와인으로 대표되는 포도 유래 식품들의 지역, 품종, 생산연도 등에 따른 대사체 프로파일 (*Food Res Int*, 2013, 54:1184-1194), LC-MS 및 GC-MS 기반 고추의 품종에 따른 극성 및 휘발성 물질 프로파일 (*Metabolomics*, 2013, 9:130-144) 등이 있음. 대부분 각 국가마다 주요한 먹거리를 대상으로 대사체학 기반 원산지 판별 연구들이 진행되고 있음.

3) 대사체학 국제 연구동향

- 전세계적으로 대사체 연구를 주도하고 미국 연구팀에는 UC Davis의 올리버 핀 교수, Noble Foundation의 로이드 섬너 박사, Scripps사의 게리 시우즈닥 박사와 Washington 대학의 지안린 한 교수가 있으며, 주로 내인성 대사체 (1차/2차 대사산물, 지질 대사체 등)에 대한 프로파일링 기술을 GC-Tof, LC/MS/MS, 및 NMR 등을 이용하여 구축하였고, 이들 대사체에 대한 데이터베이스 (Fiehn Library, MetLin DB, Lipidome DB 등) 구축을 통하여 시스템 기반의 대사체 연구를 수행 중임. 또한, 대사체 연구에서 필수적인 peak alignment/deconvolution을 자동적으로 수행하는 프로그램 (Binbase, XCMS 등) 개발, 시료 정보 및 분석 결과의 효율적 관리 프로그램 (SetupX 등) 등 대사체 연구기법 표준화를 주도하고 있음.
- 일본의 대사체학 대표 연구 그룹은 Riken의 사이토 박사, Keio 대학의 토미타 교수와 Keio 대학의 소가 교수 등이 있으며, 주로 내인성 대사체 (아미노산, 탄수화물, 핵산, 유기산 등)에 대한 프로파일링 기술을 CE-Tof MS를 이용하여 구축하였고 (900여종에 대한 데이터베이스 구축), 이 기술을 바탕으로 각종 시료 중 대사체 프로파일링 서비스 (\$ 2,500/시료)를 제공하고 있음 (Human Metabolome Technologies, Inc).
- 유럽에는 네델란드 Leiden 대학의 로버트 페포르테 교수, 독일 막스플랑크 연구소의 울프램 웨위스 박사, 프랑스 Toulouse 대학의 장 찰스 뿌르페 교수 등이 있으며 전반적으로 네델란드 대사체 센터가 유럽 대사체 연구를 주도하고 있으며, 주로 LC-SPE-NMR-MS를 이용한 시료중 미지 대사체 구조 동정, 탠덤 질량 분석기를 이용한 기지 대사체 정량 분석 및 대사체 자료 분석을 위한 통계기법 개발 등을 수행하고 있음.

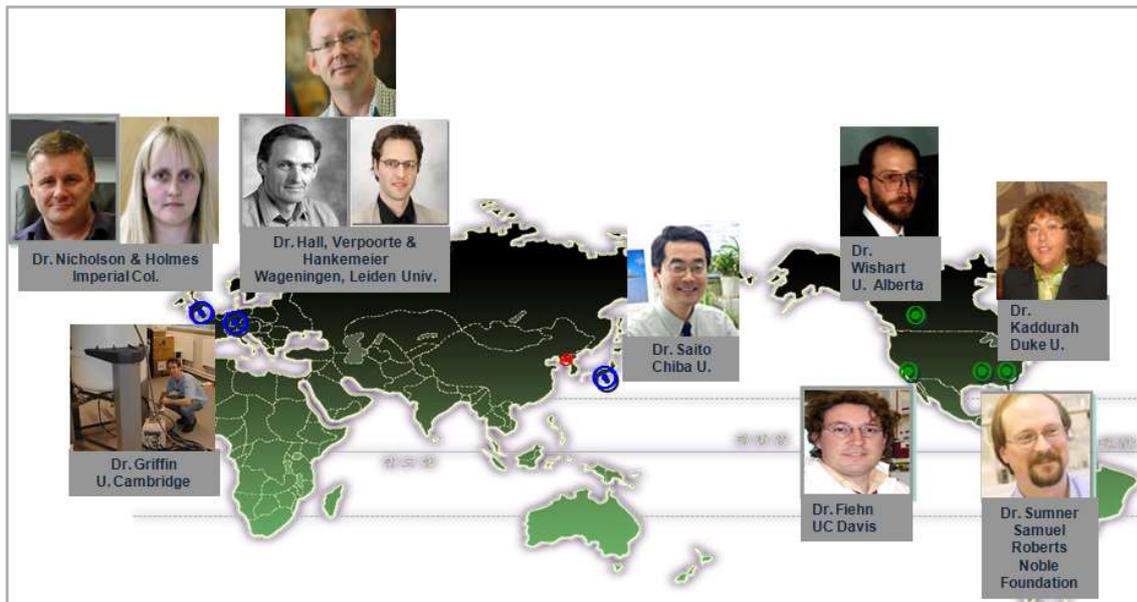


그림 5. 현재 대사체 연구를 주도하고 있는 해외 저명 대사체 연구자 및 소속 연구기관

표 1. 국제 대사체학 기반 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Wageningen University (Dr. Hall & Dr. Bino; 네덜란드)	- LC-MS, QToF-MS, NMR를 이용한 토마토, 감자 등의 식물의 대사체 분석	- QToF-MS를 이용한 식물대사체 분석 - LC-MS 기반 토마토의 metabolome DB 구축 - 토마토 휘발성 성분의 대사체학 적용 - Flavonoids의 NMR DB
Leiden University (Dr. Verpoorte; 네덜란드)	- NMR을 활용한 metabolic fingerprinting을 대표적인 천연물 소재인 마황 (Ephedra sp.)을 포함한 천연물 및 생약의 품질관리에 적용함.	- 마황의 3가지 종을 구분하는데 기존에 사용되던 에페드린류의 알칼로이드 종류뿐만 아니라 다른 2차 대사산물 (benzoic acid analogue)을 지표물질로서 발견함. - 원재료 품질관리 (quality control)
UC Davis (Dr. Fiehn; 미국)	- GC-MS, LC-MS, GC-Tof, Nanomate-LTQ system 기반 식물/미생물/인체시료의 대사체 DB구축 - 내인성 대사체 신속 동정을 위한 플랫폼 구축	- DB 및 내인성 대사체 동정 플랫폼의 관련 연구자 제공하여 대사체 연구 발전에 기여
Chiba University (Dr. Saito; 일본)	- GC-Tof MS, CE-MS 등의 이용한 식물대사체 분석 - Transcriptomics, metabolomics 등을 융합한 식물체 내의 생합성 경로 및 network 추적	- MS 기반 식물 대사체 (Arabidopsis thaliana, Lotus japonicus cell, Ophiorrhiza pumila cell, rice, Glycyrrhiza ularensis)의 high-throughput analytical techniques 개발 - 대사체학 data 분석을 위한 대사체 동정 및 bioinformatics 연구
Osaka University (Dr. Fukusaki; 일본)	- NMR을 활용한 metabolic fingerprinting을 통해서 일당귀 (Angelica acutiloba)의 품질관리에 적용	- 기존에 외관으로 품질을 판별하던 방식에 NMR 분석기법을 활용해서 일당귀의 원산지별 판별을 함. 품질을 판별할 수 있는 통계적 예측 모델 제시
Samuel Roberts Noble foundation (Dr. Sumner; 미국)	- CE-MS, GC-MS, HPLC/MS, UPLC-MS, High resolution accurate mass measurement - MET-IDEA, MSFACTs등의 data processing tool 개발	- 쌀의 성장단계에 따른 대사체 분석을 통한 바이오마커 대사체 선정 - Medicago truncatula cell, Arabidopsis thaliana, phalaris aquatica 등의 식물대사체 분석 - Mass spectrometry 기반 data processing을 위한 MET-IDEA 개발 및 Metabolomics spectral formatting, alignment and conversion tools (MSFACTs) 개발
Univ. of Valencia (Dr. Lerma-Garcia, 스페인)	- Syringe pump를 이용하여, 식물성 오일을 ion trap MS에 직접 주입하여 phytosteroid chemical fingerprint 확보	- Phytosteroid 패턴을 활용한 원산지 감별 및 품질 관리 활용

4) 데이터 프로세스 및 DB 구축의 국외 현황

○ 대사체 데이터처리: 대용량 데이터 처리 및 이와 연계된 통계분석이 가능한 상업적·공공개적소프트웨어의 개발이 활발히 진행되고 있으나, 다양한 분석기기 플랫폼에서 획득된 데이터의 연계분석이 가능한 시스템은 부족한 상황임.

표 2. 대사체 데이터 처리 관련 소프트웨어

소프트웨어	유형	분석기기	웹사이트
XCMS	R package	MS	http://metlin.scripps.edu/xcms
MetSign	MatLab	MS	http://metaopen.sourceforge.net
MAVEN	Application	LC-MS	http://genomics-pubs.princeton.edu/mzroll
rNMR	R package	NMR	http://rnmr.nrmfam.wisc.edu
MetaXCMS	R package	MS, NMR	http://metlin.scripps.edu./metaxcms
mzMine2	Application	LC-MS	http://mzmine.sourceforge.net

○ 통합적 대사체 통합 알고리즘 구축 및 DB구축 현황

표 3. 통합적 대사체 알고리즘 및 DB 구축 내용 및 활용현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Chalmers Univ. of Technology의 Nielsen 그룹	<ul style="list-style-type: none"> • 최근 Human adipocyte에 대한 genome-wide 대사체 네트워크 모델을 작성함. adipocyte에서 발현되는 7340개 유전자 정보와 기존의 공개된 대사네트워크 (KEGG, Human Metabolic Atlas, Reactome 등)를 광범위하게 집대성하여 세포 특이적인 대사 네트워크 모델을 구성함. • 네트워크는 3160 metabolites, 8100 reactions, 3668 genes으로 구성 	iAdipocytes1809 대사체 네트워크 공개 <ul style="list-style-type: none"> • Mardinoglu et al. (2013) Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. Mol Syst Biol, 9, 1 - 16.
University Medicine Charité Berlin	<ul style="list-style-type: none"> • 광범위한 문헌 조사를 통해서 Liver 특이적인 대사체 네트워크 구축 • HepatoNet1은 777 metabolites, 2539 reactions으로 구성 	HepatoNet1 대사체 네트워크 공개 <ul style="list-style-type: none"> • Gille C et al (2010) HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. Mol Syst Biol 6: 411
Tel Aviv University	<ul style="list-style-type: none"> • 전사체, 단백질체, 대사체 및 표현형 데이터를 통합 • 1827 reactions and 1360 metabolites 	<ul style="list-style-type: none"> • Jerby et al (2010) Computational reconstruction of tissue-specific metabolic models: application to human liver metabolism. Mol Syst Biol 6: 401
Chalmers University of Technology	<ul style="list-style-type: none"> • Human Proteome Atlas 데이터와 유전체, 전사체, 단백질체 및 대사체 정보를 통합하여 69 cell type (16 cancers)에 대한 metabolic network 모델 구축 • 3,397 metabolite, 1512 genes 	<ul style="list-style-type: none"> • iHuman1512 네트워크 공개 • Agren et al (2012) Reconstruction of genome-scale active metabolic networks for 69 human cell types and 16 cancer types using INIT PLoS Comp Biol 8(5):e1002518

5) 미생물 군집 프로파일링 관련 해외 기술 수준 및 연구동향

- 2000년대 이후 NGS (Next Generation Sequencing) 기술의 도입으로 한 생물개체에 대한 유전체 정보를 고품질로 신속하게 해독하고 분석하는 기술 뿐 아니라 여러 미생물 군 특히 배양이 어려운 unculturable 세균의 군집을 분석하는 방법을 도입하여 Meta-genomics의 연구 방법이 많은 분야에 적용되기 시작함 (Segata et al. 2011)
- 현재는 메타지노믹스로 얻은 미생물 군집을 다른 환경 간의 비교하는 연구분야와 미생물 군집 분석 기법을 활용하여 특정한 항생제 생산 유전자의 존재 유무, 유전자의 copy 수, 유용한 효소생산 관련 유전자에 대한 탐색 등 “functional metagenomics“의 분야로 확대되고 있음 (Cocolin et al., 2016)
- 또한 메타지노믹스는 주로 세균의 군집분석을 위한 연구 방법으로 도입이 되었으나 최근에는 여러 가지 농산물 시료 또는 환경 시료로부터 세균과 진균 모두의 군집 분석을 하는 연구가 증가 추세에 있음 (Jung et al., 2016)

6) 미생물 관련 바이오마커 발굴 해외 기술 수준 및 글로벌 시장 현황

- 특정 질병이 걸린 환자의 시료를 채취하여 메타지노믹스에 의한 미생물 군집 분석을 하고 질병의 원인 미생물 군을 탐색하여 바이오마커를 발굴하기 위한 소프트웨어가 개발되고 있음. (Bhute et. al., 2016)
- 세계 바이오마커 시장은 주로 맞춤형 신약 개발에 초점이 맞추어져 있으며 2005년 54억 달러에서 연평균(CAGR 2005년~2012년) 21.6%로 성장하여 2012년에 212억 달러의 시장을 형성한 것으로 예측하고 있음. 특히 바이오의약품의 성장과 함께 proteomics를 기반으로 하는 바이오마커 시장은 2005년에서 2012년 사이 연평균 30.8%로 성장하여 2012년 105억 달러 시장 규모로 바이오마커 전체 시장의 50%를 육박하는 가장 큰 시장을 형성할 것으로 예상되고 있음 (*출처: Business Insights)
- 바이오마커에는 DNA, RNA 같은 핵산(유전자), 단백질, 지방질, 대사물질 등과 그 패턴의 변화 등이 이용되고 있으며, 사용 목적에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 한 가지 바이오마커를 여러가지 용도로 사용할 수 있음 (*출처: Business Insights)

표 4. 세계 바이오마커 시장 성장률

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	CAGR ('05~'12)
Genomics	1.0	1.1	1.3	1.4	1.7	1.9	2.2	2.6	14.6
Proteomics	1.6	2.0	2.6	3.3	4.4	5.8	7.8	10.5	30.8
Metabolomics	0.1	0.2	0.2	0.3	0.5	0.7	1.0	1.4	45.8
Bioinformatics	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	17.0
Imaging	2.2	2.5	2.8	3.1	3.5	4.0	4.7	5.5	14.0
합계	5.4	6.2	7.4	8.8	10.8	13.3	16.7	21.2	21.6

7) 유전체정보 기반의 원산지 판별 해외 기술개발 수준 및 지식재산권 현황

- (DNA 바코딩을 활용한 판별 기술 개발)
 - 식별이 가능한 유전자의 염기서열을 판독하여 그 특이성을 바탕으로 농산물의 유래를 판단하고 분류하는 것이 가장 직접적인 방법이므로 DNA 바코딩을 활용한 판별 기술이 개발되고 있음.
 - 염기서열의 판독과 비교를 위해서는 적절한 데이터베이스가 필요한데 생물별로 특이적이면서 보편적으로 갖고 있는 유전자의 염기서열 정보를 적외선 바코드처럼 생물 그 자체의 정보로서 활용하는 기술이며 범국가적으로 다양한 DNA 바코딩 프로젝트가 수행중임 (www.barcodeoflife.org).
 - 그러나 PCR 이후 염기서열분석이 필요하기 때문에 다른 기술과 비교하여 추가적으로 비용 및 시간이 요구됨. 따라서 분석 기술의 특성상 현장에서의 신속한 활용에는 극복해야 할 문제들이 있음
- 수산물의 경우 mitochondrial DNA의 염기서열을 판독하여 구분하였는데 (Asensio Gil et al. 2007; Wong et al. 2008), 예로 68개의 해산물로부터 mitochondrial cytochrome c oxidase I 유전자의 염기서열을 판독하고 비교함으로써 해산물의 원종을 구분한 연구사례가 있음 (Wong et al. 2008)

○ (Polymorphism을 활용한 판별 기술)

- 염기서열에서 하나 또는 그 이상의 염기서열의 차이를 보이는 유전적 변화를 측정하여 그 다형현상으로부터 유전적 특이성을 측정하여 농산물(식품)을 판별하는 방법으로 단일 생물종간에는 단일 핵산염기 다형현상(Single Nucleotide polymorphism, SNP)이 일어나며 이 같은 영역을 주로 타겟으로 함

- 분석 기술로서 restriction fragment length polymorphism (RFLP), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (변형으로써 ISSR, SSAP, ASMPL) 등이 널리 사용되고 있고 유전적 변이를 측정하는 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 활용하기도 함 (Galimberti et al. 2013)

- 닭고기의 경우 신선, 가공 또는 고압멸균 고기와 고기제품으로부터 mitochondrial D-loop유전자를 타겟으로 RFLP를 활용, 분석한 사례가 있으며 (Mane et al. 2009) 몇몇 종의 어류로부터 mitochondrial cytochrome b 유전자를 타겟으로 RFLP를 활용, 분석한 예도 있음 (Hold et al. 2001)

- 시판용 잼과 요거트에서 식물 유래의 chloroplast rbcL 유전자를 타겟하여 분석함으로써 식물종을 판별하였고 (Ortola-Vidal et al. 2007) 과일의 경우 과일에 존재하는 특이적 효모를 PCR-DGGE를 수행하여 그 차이점을 분석함으로써 과일의 종을 분석하기도 하였음 (El Sheikha et al. 2012)

- 이 기술은 PCR을 수행 한 후 추가적인 전기영동을 수행하여 다형성을 확인해야 하므로, 현장 적용 분석기법으로 활용하기에는 적합하지 않은 제한이 있음

○ (특이적 프라이머를 활용한 판별 기술)

- 다양한 종의 판별 가능한 유전자의 염기서열 정보를 이용하여 특이적 프라이머를 사용하면 종의 판별이 가능함. 생물 유전자에 대한 특이적 프라이머를 활용하여 그 생물의 유래를 판단하는 기술은 빠르게 분석이 가능함

(예) ① 육류- mitochondrial D-Loop 영역(Mane et al. 2012), mitochondrial cytochrome b 유전자(Zhang et al. 2007; Dooley et al. 2004), mitochondrial 16S and 12S rRNA 유전자(Sawyer et al. 2003; Rojas et al. 2010), cytochrome oxidase I 유전자(Kitpipit et al. 2014), mitochondrial ATPase 8 gene(Colgan et al. 2001) 대상의 프라이머 사용 ② 과일류- internal transcribed spacer (ITS) 및 plastid DNA를 타겟하는 특이적 프라이머를 제작하여 체리 및 berry의 종을 판별함 (Serradilla et al. 2013; Jaakola et al. 2010) ③ 토마토, 당근, 셀러리, 아몬드- lipid transfer protein gene2, major allergen, 18S rRNA 유전자를 타겟하여 DNA melting curve를 활용하여 판별할 수 있는 방법을 개발함 (Pafundo et al. 2011)

- 최근에는 두 개 이상의 primer 세트를 활용한 multiplex PCR로 시간을 단축시키고 있으며 (Asensio Gil et al. 2007), Real-time PCR (실시간 정량 PCR)을 활용하면 추가적인 post-PCR과정을 수행할 필요가 없고 가수분해 되는 probe 시스템을 사용할 경우 반응 특이성을 향상시킬 수 있음

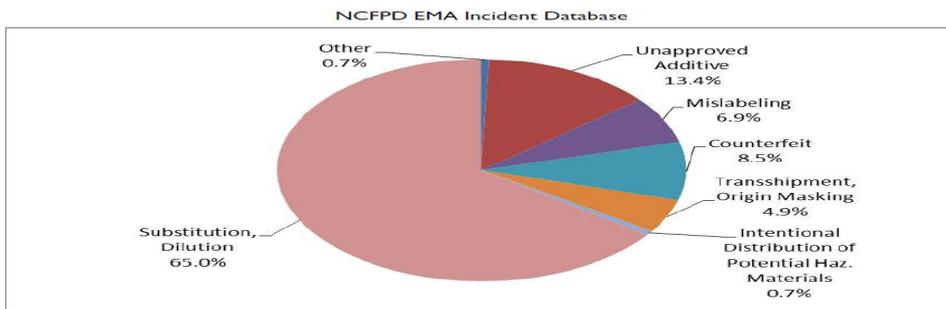
- 농산물의 경우 토양환경에 존재하는 근권미생물과 상호작용하며 이들의 상호 특성을 규명함으로써 작물의 종을 규명할 수 있기 때문에 이를 활용한 연구가 시작단계에 있음 (El Sheikha et al. 2012)

다. 사회 문화적 측면에서의 기술개발 중요성 및 필요성

- “원산지”란 그 물품이 성장 했거나, 생산·제조·가공된 지역을 말하며, 수출입 물품의 경우 국적을 의미함. 원산지 관련 국제규범은 WTO GATT 제9조(Marks of Origin), 원산지 규정에 관한 협정 및 WCO Kyoto 협약부속서(D.1 내지 D.3)에서 규정하고 있으나, 각국은 자국의 이익에 따라 해석·적용하여 원활한 무역을 저해 하는 경우가 있음.
- 전 세계적인 자유무역협정 (FTA)의 확대로 농산물들이 자유롭게 각국의 국경을 넘나들 수 있는 가능성이 커졌으나, 국가들 간의 교역을 통해 농산물의 원산지가 위조되어 판매 되는 경우가 발생하여 시장 질서를 교란시키고 소비자들의 불신을 사고 있음.
- 우리나라의 원산지 표시제도는 1991년 7월 1일 부터 시행되고 있으며, 대외무역법령에 「원산지 판정 기준」, 「원산지 표시 대상 물품」, 「위반시의 벌칙」 등 에 관한 규정을 두고 있음. 관세법령에는 통관 시의 원산지 및 그 표시의 확인 및 시중 유통 과정에서의 단속 등에 관한 규정을 두어 운영하고 있음.
- 농산물품질관리원은 2014년 4290개 업체가 농식품의 원산지를 속여 판매하다 적발되었다고 밝힘. 원산지를 위조하다 적발된 업소는 2012년 4642개 업체, 2013년 4443개 업체보다는 소폭 감소하였지만, 여전히 하루에 10개 이상의 업체가 적발되었음. 품목별로는 배추김치가 전체 적발 건수의 25.2%를 차지해 가장 많았음. 돼지고기(21.6%), 쇠고기(12.4%), 쌀(7.6%)이 그 뒤를 이었음. 업종별로는 음식점이 2484건으로 전체의 57.6%를 차지했으며, 이어 식육점 403개소, 가공업체 381개소, 수퍼마켓 195개소 등의 순이었음. (조선비즈 2015년 1월 15일자 보도)
- 정부에서는 “불량식품”을 4대 사회악 중 하나로 포함시켜서 이의 근절을 위해 다각적으로 심혈을 기울이고 있으나, 식품으로 직접 사용되거나 가공식품의 주요 원료가 되는 농산물의 원산지 변조를 막지 못하고 있음. 이는 원산지를 변조하여 얻는 경제적 이익에 비해 이의 근절을 위한 단속이 아직 부족한 것도 큰 원인으로 여겨짐.
- 이에 농산물의 원산지를 과학적으로 판별하는 것은 국가적으로 중요한 사회문제로 대두되고 있으며, 과학적이고 객관적인 판별법의 확보가 시급한 실정임.

라. 경제 산업적 측면에서의 기술개발 중요성 및 필요성

- 원산지 판별 기술은 원산지를 속여 부당한 이득을 취하는 행위를 단속할 수 있는 중요한 도구가 되며, 국내 유통 농산물의 시장질서 확립과 소비자들의 신뢰 확보를 위해 필수적임.
- 정부에서는 시중에서 유통되고 있는 모든 농산물에 대한 원산지 표시를 의무화하고 단속을 강화하는 일련의 조치를 시행하고 있으나, 농산물의 원산지 변조를 근절하는 것은 현실적으로 매우 어려운 상황임. 이에 농산물을 재배하는 농가의 피해를 최소화 하고, 원산지를 위조하여 파는 불법 행위를 막기 위해서는 농산물의 원산지를 과학적으로 판별할 수 있는 방법을 개발하고, 이에 대한 자료들을 통합적으로 DB화하여 관리하는 것이 시급함.
- 농산물의 원산지 판별은 자국의 수출입물품에 대한 객관적인 통제를 가능하게 할 수 있으며, 국가간 교역 시 경제적 불이익으로부터 벗어날 수 있음. 한편, 국립농산물품질관리원에서는 농산물에 대해 “지리적기원표시제도”를 실시함으로써 ① 시장차별화를 통한 농산물 및 가공품의 부가가치 향상 및 지역경제 발전 ② 생산자단체가 품질향상에 노력함으로써 농산물의 품질향상을 촉진 ③ 생산자단체간의 상호협조체제가 원만히 구축될 경우 생산품목의 전문화와 농산물 수입개방에 효율적으로 대처 ④ 소비자입장에서는 지리적표시제에 의해 보호됨으로써 믿을 수 있는 상품 구입(소비자 보호) ⑤ 정부의 입장에서는 지역의 문화유산의 보존 등의 효과를 얻고자 하며, 장기적으로 지역특산물을 육성하는 효과적인 방안으로 추진하고 있음. 국내 유통 농산물에 대한 원산지의 판별은 이러한 “지리적기원표시제도” 시행에 근간이 될 수 있음.
- 미국 식품생산자협회(Grocery Manufacturers Association)는 식품 위변조가 전 세계 식품 산업 중 연간 100억~150억 달러를 차지하고, 전체 상업적으로 팔리는 식품 중 10%를 차지한다고 예측함. 그리고, 전체 위변조 식품 중 약 5% 정도가 원산지 위변조에 의한 것임.



Source: Compiled by NCFPD EMA Incident Database (January 6, 2014), based on 306 reported incidents.

- 국내에서도 농산물 및 식품의 위변조 규모는 정확하게 알려져 있지 않지만, 전세계적인 추세를 감안하면, 국내전체 시장 규모의 10% 정도 차지하는 것으로 예측됨. 그리고, 이 중 약 5%, 즉 국내에서 유통되고 있는 전체 농산물 및 식품 중 약 0.5 % 정도가 원산지가 위변조 되어 유통되고 있을 것으로 추정됨.

마. 기술적 측면에서의 기술개발 중요성 및 필요성

- 소고기의 원산지 판별에 유전자 검사를 활용한 판별법이 활용된 바 있으나, 동질의 유전자형을 가진 농산물들의 원산지에 따른 구분에는 활용될 수 없음.
- 동질의 유전자형을 가진 농산물들의 경우라도 재배 환경(토양, 기온, 강수량, 일조량 등)에 따라 품질에 차이가 생길 수 있으며, 이는 주로 농산물의 재배 및 수확 후 생성되는 다양한 일차 및 이차대사산물들의 차이에서 기인됨.
- 농산물과 같은 식물체들은 품종에 따라 서로 다른 다양한 일차 및 이차대사체들을 생성하며, 이들 대사체들에 대한 통합적인 정보는 지문과 같은 방식으로 농산물의 원산지 구분에 활용될 수 있음.
- 농산물의 원산지 판별은 주로 isotope-ratio mass spectrometry(IRMS), HPLC, visible micro-Raman spectroscopy, ultraviolet-visible absorption spectroscopy(UV-vis), elemental analysis-like inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry(ICP-AES) 등을 활용한 화학적 분석으로 이루어져 왔음. 그러나, 이들 연구방법들은 모두 특정 성분이나 그룹에 초점을 맞추어 온 targeted 접근방법이었음.
- 이에 비해 대사체학은 농산물 내 전대사체를 non-targeted 방식으로 분석하는 접근방법이며, 유전적 차이나 환경적 변화에 대한 차이를 효율적으로 규명할 수 있음.
- 농산물 내 전대사체를 효과적으로 분석하여 원산지 판별에 활용하기 위해서는 표준화된 시료 수집 및 전처리는 물론, NMR, GC-MS, LC-MS 등과 같은 다양한 분석기기의 활용이 핵심이며, 이로부터 얻어진 방대한 데이터를 처리하고 유용한 정보들(바이오마커 등)을 도출해 낼 수 있는 데이터프라세싱 및 다변량통계기법이 구축되어야 함.
- 또한, 이러한 연구기법은 농산물의 원산지 판별 이외에도 농산물 내 대사체 생성과 환경적 요인들의 상관관계 규명에도 활용될 수 있으며, 이는 향후 농산물들의 품질 개선에도 적용 가능함.
- 구축된 통합 데이터베이스 및 네트워크는 향후 지속적으로 축적 보장될 수 있으며, 이를 활용한 농산물 원산지 단속이 가능함.

1-3. 연구개발 범위

○ 연구개발 최종 목표

- 대사체 지문 및 미생물 군집 분석 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용

○ 연구개발 세부 목표

- 1) 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립
: 전대사체 분석, non-targeted 분석
- 2) 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 (농산물 3종: 대두, 참깨, 쌀) 및 네트워크 구축
: NMR, GC-MS, LC-MS 데이터 통합
지역별, 연도별 데이터 구축 및 고도화
- 3) 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수(환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명
- 4) 농산물 원산지 단속에 실제 활용 : 농산물 1종 이상
- 5) 대상 농산물의 원산지별 시료로부터 미생물 군집 분석을 위한 인프라 연구
- 6) 원산지별 농산물 시료의 미생물 메타지노믹스 해독 및 분석
- 7) 원산지별 미생물 군집의 변이 비교 분석 및 차별화된 미생물 군집 탐색
- 8) 원산지 판별 가능한 미생물군 활용한 바이오 마커 발굴 및 적용성 시험

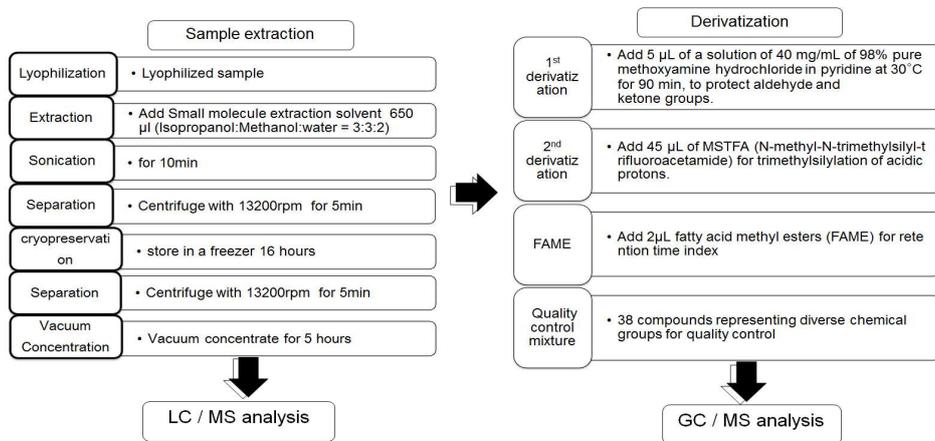
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 이론적, 실험적 접근방법

가. 연구개발 추진전략 및 방법

(1) 과제 참여 연구팀 전문 영역의 분야별 경쟁력 확보 및 유기적 연계

▶ 고속다중 대사체 프로파일링을 위한 대사체 추출방법, 추출용매 및 질량기기분석 조건의 최적화



○ 대사체 추출 방법 및 추출 용매 최적화: 대사체는 유전체나 단백질체와는 달리 각각 아주 상이한 physio-chemical 특성을 갖고 있으므로, 효과적인 대사체의 추출을 위해서는 추출방법 및 추출용매의 조성의 최적화가 매우 중요함. 그러므로 다양한 극성을 띠는 물질의 효과적인 추출을 위해서 물, 메탄올, isopropanol, acetonitrile, chloroform 등의 다중용매 조성의 테스트를 통한 가장 효과적인 extraction solvent system을 확립하고 이는 수율(recovery), 재현성 (reproducibility), coverage(다양성), peak intensity(감도) 등의 다양한 평가 지표를 통해 최종 평가를 수행하였음. 또한 대사체 획득수율을 고효율성을 위하여, 화학적 세포파쇄와 동시에 물리적 힘에 의한 세포 파쇄 방법 (cell disruption method)가 요구되며, 대표적인 방법으로 homogenizer의 방법을 들 수 있음. 본 연구자는 다양한 세포에서 가장 효율적인 대사체 획득방법을 다년간 연구해 왔으며 그중, 세포조직을 동결건조하여, 이후 stainless steal ball의 높은 밀도와 high frequency homogenization을 이용한 세포파쇄 방법을 접목하여 대사체 추출효율과 속도를 극대화 하였음.

▶ 기초 및 2차 대사산물 정보 분석을 위한 초고속 정밀 질량분석 시스템의 최적화와 활용

- 주요 일차 대사활동(primary metabolism)은 생물체의 성장 및 생존을 위한 기본적인 대사과정으로 해당과정(glycolysis), TCA cycle, 아미노산(amino acid) 대사과정, 지방산(fatty acid) 대사과정, 핵산(nucleotide) 대사과정, 오탄당 인산화 과정(pentose phosphate pathway) 등이 이에 속함. 이러한 기초 필수 대사산물은 DNA 또는 단백질과는 달리, 종에 관계없이 공통적으로 내포한 필수 화합물로서 비교적 소규모 단일 라이브러리와 DB를 구성함으로써 모든 종의 대사연구에 연동 가능함.
- 이에 따라 본 연구실은 1400 개가량의 필수 기초 대사산물로 구성되어 있고, 정밀 검증(manual curation)된 Fiehn library와 가장 방대한 양의 스펙트럼(mass spectrum)을 보유하고 있는 NIST library를 사용하여 주요 일차대사산물의 효과적인 동정을 실시하였음.
- 기초 주요 대사물질은 대부분 분자량 1000 dalton(amu) 미만의 저분자 물질이므로, 자체로 gas phase로 변화, 또는 단순한 유도체화 과정(derivatization step)에 의해서 기체화할 수 있으므로, 분석장비로는 재현성, 감도등이 우수하며 시스템 운용의 안정성을 확보하기 용이한 기체크로마토그래피 분리방법(gas-chromatographical separation)이 가장 적합함. 30 m 가량 이르는 분석컬럼을 이용한 긴 구간의 기체상 분리방법은 분리능을 극대화 하면서, 동시에 분석시간을 25분 이하로 최소화할 수 있는 장점을 바탕으로 고속다중(high-throughput) 분석이 가능함.
- 특히 질량분석의 주 시스템으로 사용될 time-of-flight(TOF) 질량분석 시스템(mass spectrometer)은 최고의 스캔속도(500 scan/sec)와 고성능 deconvolution 기능이 접목된 최첨단 장비로써, 복잡한 시료 매트릭스에서 동시 용출물질 또한 크로마토그램상의 특이적 패턴을 인식함으로써 각각의 개체물질로 분리·동정이 가능함. 또한 데이터의 수집 및 정량 그리고 정성 분석이 동시에 이루어지며, 약 200 개가량의 일차대사산물의 결과를 얻을 수 있는 초고속 시스템으로써, 다수의 샘플 분석과 비교를 통해 높은 통계적 유의 수준의 고급 데이터를 수집하여 다양한 대사활동의 역학적 유동성(metabolic dynamics)의 정밀하고 포괄적인 정량분석을 하는데 유용함.
- 또한 TOF 질량분석 시스템의 높은 감도와 광범위 정량범위(dynamic range)은 아주 소량의 샘플을 정량적으로 비교하기 위한 최적의 시스템이며, 이는 15 ul의 소량 샘플의 분석에 이미 증명된 바 있음, 적용단계에 있어, 극소량의 시료으로부터 추출한 다양한 대사체의 정밀한 정량분석을 달성하는데 최적화된 시스템임.

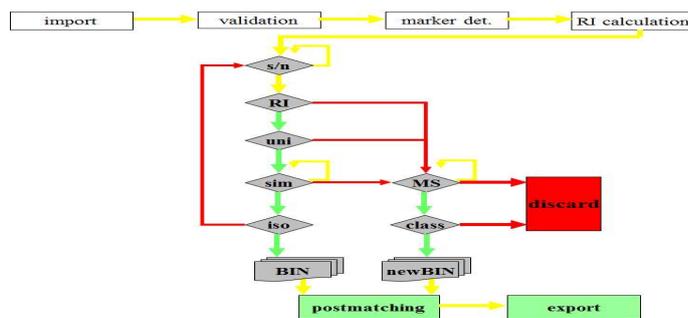


그림 6. In-house 시스템을 이용한 기초대사화합물 동정 및 상대정량 자동화 시스템 적용

▶ 다양한 생물정보학 기법을 이용한 생체지표 제시 및 반응대사 작용기작 분석

- 질량분석 시스템으로부터 산출된 방대한 데이터는 고성능 자동계산(computation)과 대용량 데이터 처리능력 및 생물정보학의 효과적인 연계를 요구하며, 이를 통해서 대상 생물체의 생리학적·병리학적 특징과 생분자 수준의 대사과정 기작을 통합적으로 이해하고 규명할 수 있음.
- 질량분석을 통해 얻어진 신진대사 최종산물의 통합적 정량분석을 통해 정상군과 질병군의 생체액으로부터 메타볼롬 수준의 분자표현형(metabolomic phenotype)을 확보하여 그 차이를 분석하고 농산물/원산지 특이적 대사활동의 거시적 유동성을 규명하였음.
- 농산물/원산지 특이적 메타볼롬 표현형 확보를 위해 다변량 주성분 분석방법(principal component analysis: PCA)이 유용하게 사용하였음. 이는 뇌질환으로부터 기인한 대사체 전체의 변화를 대표변수들로 요약, 농산물/원산지 특이적 대사체군을 생체지표로 선별하는 방법으로도 적용가능하며 이를 통해 단일 변수의 생물학적 다양성에 기인한 생체지표 선별 오류를 최소화 할 수 있음. 이러한 시스템 수준의 생체지표 모델 정립을 위해 PLS(Partial Least Squared) 통계기법, PLS-DA(PLS Discriminant Analysis) 또는 OPLS(Orthogonal PLS) 뿐만 아니라, 다양한 클러스터링 기법 (clustering analysis; HCA, SOTA, relevance network)을 적용하였음.

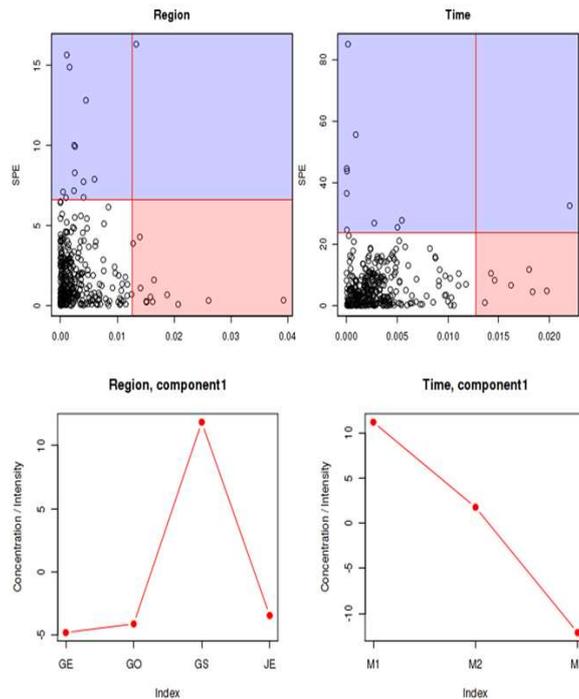


그림 7. 다변량 모델-ANOVA 통합적 분석을 통한 숙성도 독립적-원산지 특이적 대사체 지표 규명 (Food Research International, 2013)

- 최종대사산물의 정량분석을 통하여 원산지 차이로 인해 변화를 보이는 대사물질을 스크리닝하고, 관련 대사경로의 총체적 분석을 통해 질병작용기작을 시스템 수준에서 규명함. 먼저 기본적인 통계기법인 단변량 분석 (univariate statistics; t-test, ANOVA, MANOVA)을 사용하여 단일분자 수준에서 직·간접적으로 영향을 받는 대사체를 선별. 이를 생리학적 관점에서 검증하고 생체지표로의 적용 가능성을 고찰. 선별된 대사산물의 원산지 예측 민감도를 분석하고, 연도별 변화경향과 연계된 유동성을 검증하였음.
- 이와 함께 특이적 대사활동 작용기작을 규명하기 위해, 단일분자 수준의 생체지표를 연관 대사경로 (metabolic pathway) 수준으로 확장하여, 미세하지만 일관성 있는 유동성을 분석하여 다양한 생물학적 특징과 대사작용 (biological process)과의 상관성을 밝혀내고 그 기작을 규명하고자 함. 이는 총괄적 대사경로 통계분석 (Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA), Metabolic Pathway Analysis (MetPA))을 통하여 수행할 계획이며, 시스템 수준에서 원산지 특이적 대사적 변화를 성공적으로 감지하며 거시적 대사지표로 활용하였음.

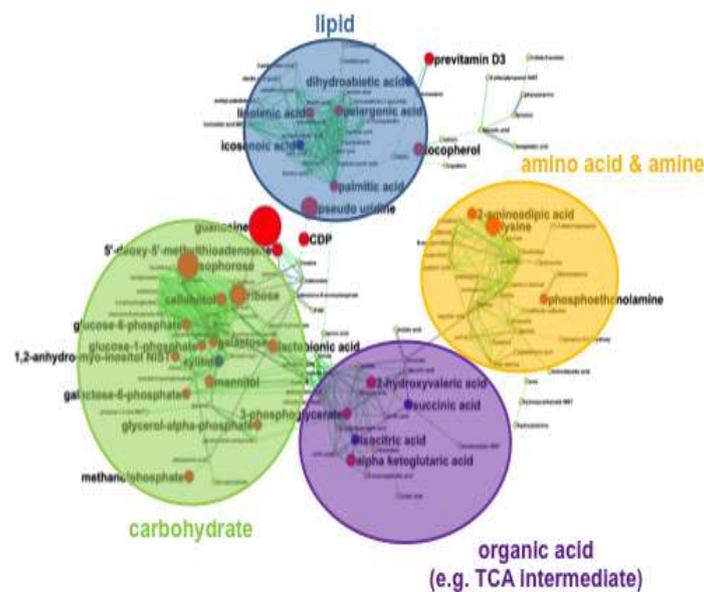


그림 8. 대사체간의 다중연결고리 상관관계 분석을 통한 대사네트워크 연구 (Plos One 2013).

(2) 대사체 지문 활용을 통한 농산물 원산지 판별 관련 총체적 정보 확보 및 바이오마커 발굴

▶ 대사체 네트워크 모델구축을 통해 농산물 대사·생리학적 변화를 시스템 수준에서 규명

- 대사체간 상관관계의 유동성 분석을 통해, 농산물 종류/원산지/수확연도에서 기인된 대사조절기작 (metabolic regulation)의 잠재적 변화를 예측하고, 이를 시스템 수준의 정성·정량화된 모델 제시를 위해 대사체 네트워크 구축함.
- 먼저 각 대사체간 선형 상관관계 (metabolite- metabolite linear correlation)의 조직적 연계를 통한 대사체 네트워크를 구성하고 환경변화에 따른 잠재적 조절기전 (metabolic regulation)의 변화를 네트워크 위상기하학적 정성 분석 (network topology)을 통해 탐지함.
- 이는 베이저안 통계적 방안 (Bayesian statistic)을 적용함으로써, 선형 상관관계의 일반적 위험요소인 긍정 오류 (false positive)의 비율을 대폭 감소시키고 통계적 유의수준이 높은, 대사체간 확률적 상관관계 (probabilistic relationship) 구성을 통한 완성도 높은 대사 네트워크 (metabolic network)를 구축하였음.

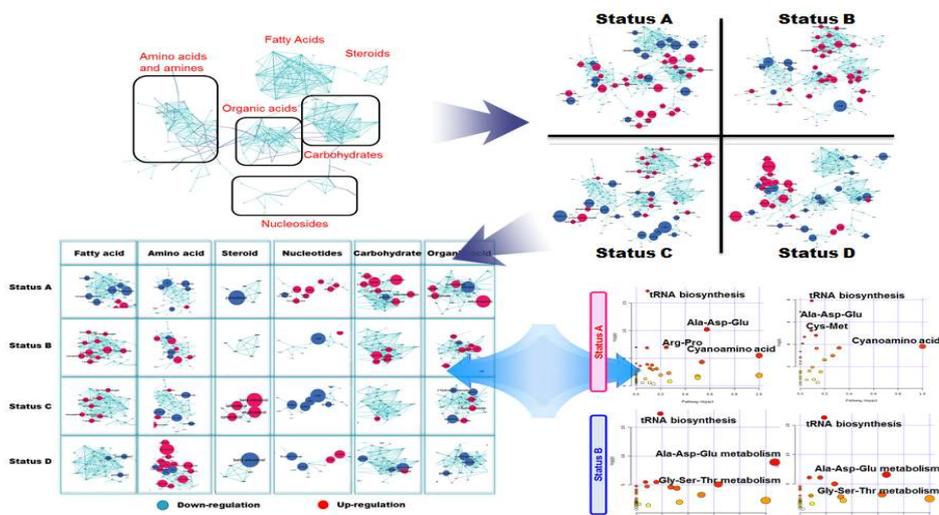


그림 9. 총괄적 대사네트워크 분석법을 적용한 일차 및 이차 대사유동성 규명

- 또한 본 연구팀이 개발에 참여한 알고리즘을 적용한 네트워크 구성체 분석을 통해 원산지 예측을 개별 대사체의 변화에 의존하지 않고, 생화학적 모듈 (biochemical module)의 거시적 패턴 변화를 모니터링함으로써 농산물표현형의 다양성 (variation) 및 복잡성에 저항성 (robustness)을 가진 네트워크 모델 구축이 가능함.
- 이는 화학구조 유사성 (chemical structure similarity)에 의한 타니모토 연산 (Tanimoto score)과 화합물 반응 기작 (KEGG reaction pair)의 1차적 연결고리의 다중결합 (multiple connection)을 통해, 새로운 형태의 2차원적 대사기전 네트워크 구조를 형성할 수 있음.

- 이러한 네트워크 모델은 대사체간 상관관계 (network edge)의 정적인 요소를 통해 네트워크 구조의 안정성을 확보하고, 데이터 의존적인 중심점 (network node) 설정의 유연성 (flexibility)과 대사체 발현 유동성 (statistical significance, fold change, change direction)을 동시에 표현함으로써 거시적 패턴인식과 네트워크 수준의 통계적 정량화가 가능함.
- 정준상관분석 (rCCA)에 의한 네트워크 구성을 통해, 원산지에 따른 다양한 환경요인에 대한 매개변수 (parameter)와 메타볼롬 수준의 측정 대사체의 발현 양상을 정량적으로 연계 (coordination)하고자 함. 이를 통해 농산물 표현형의 다양성과 연도별 대사체 변화를 연합적으로 정량화가 가능함.
- ▶ **빅데이터 프로세스 및 통합적 연계분석을 통한 농산물 원산지 판별 모델 구축 및 활용**
- GC-TOF MS, LC-QTOF MS, NMR 등에서 획득한 기초대사화합물, 2차대사산물 및 휘발성대사산물에 대한 데이터 통합을 통한 대사체 정성·정량 DB를 확보함.
- 원산지별 농산물 대사체에 영향을 줄 수 있는 환경요인, 유전요인 DB를 확보함.
- 데이터베이스는 1차적으로 획득된, 모든 raw data를 포함하는 metadata level 1으로 저장 관리할 계획임. 이는 각각 분석기기 플랫폼별 저장공간을 독립적으로 확보함.
- 2차 level의 metadata는 1차 DB에서 통계적 유의수준이나 독립 또는 통합적 바이오마커 후보물질군을 분류된 metabolic feature의 동정여부에 관련 없이, spectrum, retention 등의 분석화학적 정보와 함께 독립된 DB 구축
- 2차 DB (metabolic feature DB)에 포함된 후보물질군중 연구기간동안 동정된 물질을 기반으로 compound DB를 구축
- Compound DB에 등록된 물질을 중심으로 pathway DB로 연계확장
- 본 연구에서 구축될 대사체 데이터베이스를 활용하여, 기존 검사시간 대비 1/2 정도의 시간 안에 농산물의 원산지를 판별하는 것을 목표로 함
- DB별 정성정량 분석을 통하여 다양한 분자수준에서 정량적 변화를 보이는 component의 통합적 mapping을 통한 1차적 데이터 연계 및 해석이 가능함.
- 이를 통해 metabolic reactions, pathways, modules 수준의 단계적 대사유동성을 평가가 가능함.

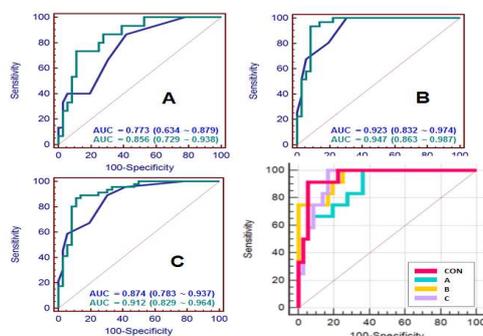


그림 10. Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis를 통한 생체지표 모델검증
(*Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2016)

▶ 빅데이터 저장 및 효율적 관리

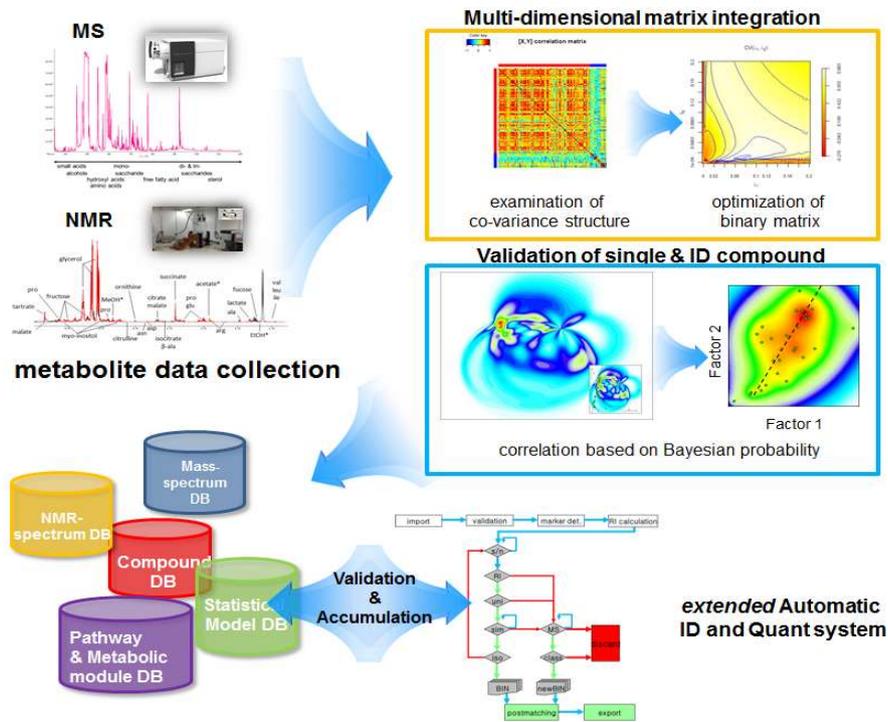


그림 11. 멀티플랫폼 분석기기 운용 및 통합적 데이터 프로세스/DB 구축전략

- 개별적 데이터 frame내에서 유의수준을 보이는 component 위주의 mapping의 한계를 극복하여, 작지만 총괄적 유용성을 보이는 인자들의 통합적 데이터 연계 및 해석을 위한 expression-based 데이터 연계방법을 병행함.
- 이는 다면 복합연계 상관모델을 통하여, 분자구성요소 중 metabotype을 연계적으로 설명할 수 있는 군과, 각각 MS-specific, NMR-specific한 특징을 갖는 군으로 분류하여 개별적 유용성과 별개로 데이터의 통합을 통한 개체군을 분자수준에서 가장 잘 설명할 수 있는 분자 모델 구축 후, contribution factor의 총괄적 선별작업을 통한 네트워크 모델을 구축하였음.
- 이를 위해 orthogonal partial least squared algorithm 및 정준상관분석(regularized canonical correlation analysis)의 비교분석을 통하여 최종모델을 결정하였음.
- 정준상관분석(rCCA)에 의한 네트워크 구성을 통해, 환경적·유전적 매개변수(parameter)와 메타볼롬 수준의 측정 대사체의 발현 양상을 정량적으로 연계(coordination)시키고자 함. 이를 통해 원산지별 농산품 관별을 위한 대사체 변화를 연합적으로 정량화 (metabo-typing of disease progress)할 수 있음.

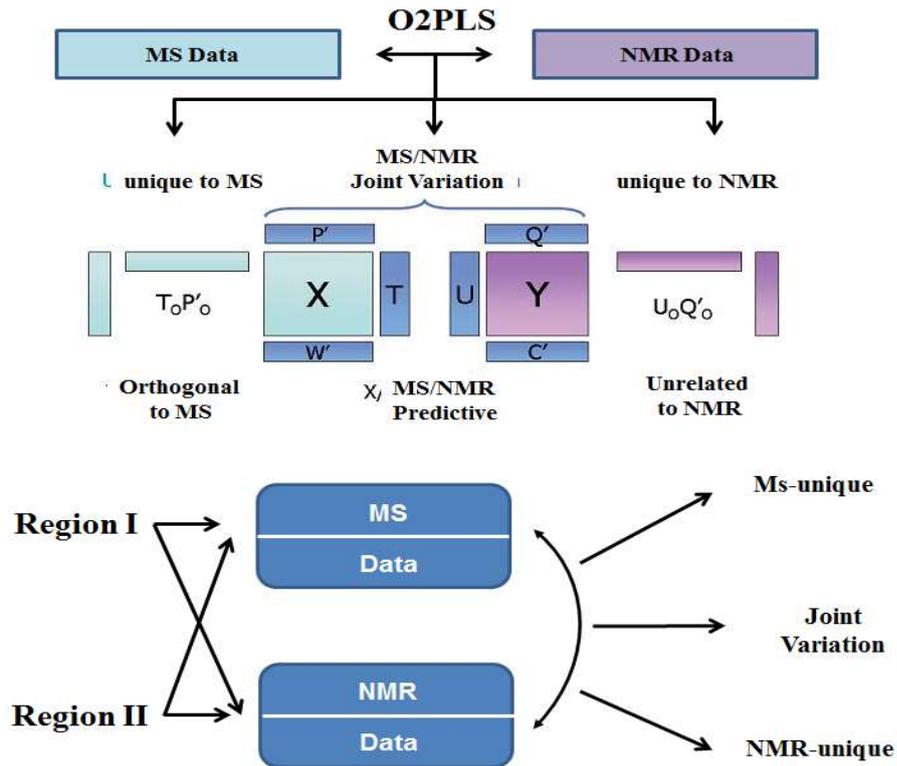


그림 12. Two-way orthogonal partial least square (O2PLS) 통계방법을 통한 빅데이터 융합

다. 농산물 판별을 위한 메타지놈 시퀀스 데이터 생산 및 미생물 군집 분석 전략

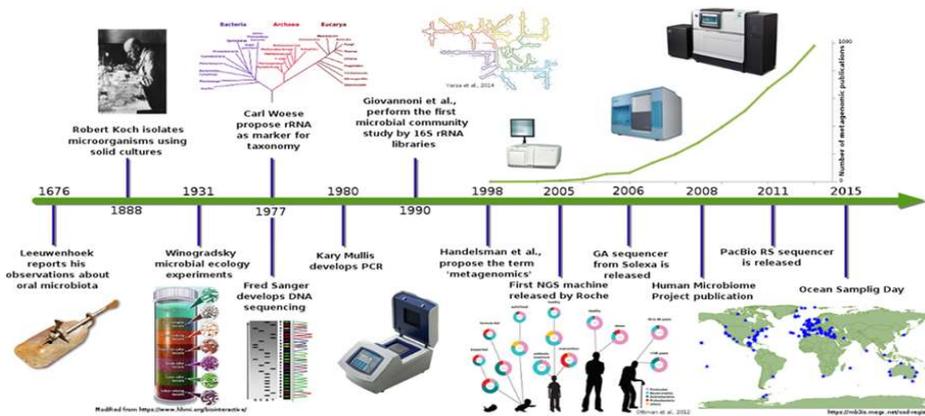
▶ 농산물로부터 미생물 total genomic DNA 추출법 확립

- 기존의 메타지놈 시퀀스 데이터를 활용한 미생물 군집 분석은 주로 식품, 토양 등 미생물 군집의 복잡성이 높은 시료로부터 배양이 불가능한 혐기성 균들까지 정성, 정량적으로 분석해 낼 수 있다는 장점을 활용한 연구에 주로 활용되었음.
- 현재까지 메타지노믹스를 위한 시료 준비 중 가장 난이도가 높은 시료가 토양이라고 알려져 있는데 각종 유기물, 무기물이 혼합되어 있는 토양시료로부터 미량으로 존재하는 미생물 개체로부터 total genomic DNA를 추출하는 것이 실험적인 bottle-neck이었으나 상품화된 DNA추출 kit로 출시 되어 있어서 활용할 수 있음.
- 그러나 여전히 DNA를 추출하기 전 시료의 종류가 무엇인가에 따라 미생물 DNA를 추출해 내기 이전의 전처리가 매우 중요한 시퀀싱을 위한 quality의 DNA 확보를 좌우하는 변수로서 본 연구팀의 타 과제 수행에서의 결과를 참고하여 농산물 별로 전처리 방법을 보완할 것이며 농산물 시료 자체의 genomic DNA가 최대한 오염되지 않도록 미생물 군집의 DNA 추출법을 확립할 필요가 있음.
- 본 연구에서는 대상 농산물의 특성과 미생물의 특성, 즉 부생적으로 농산물 겉면에 환경으로부터 기인하여 군집을 이루고 있는 미생물 군은 어떠한 것이 있는지, 농산물 (작물) 세포 내부에 기생 또는 공생을 하는 미생물 군집은 어떤 것이 있는지 등, 여러 가지

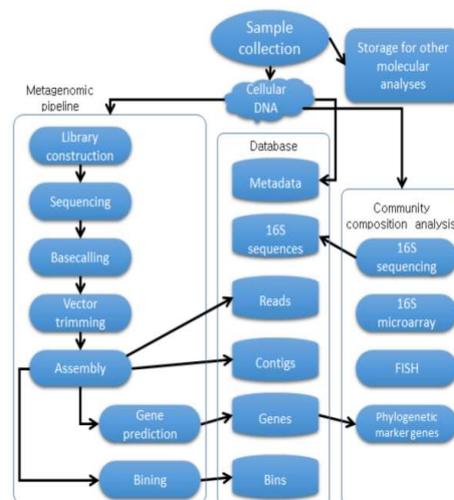
사전 조사가 반드시 필요하므로 1차년도에 대상으로 정해진 농산물에 대한 미생물 관련 자료와 농산물의 원산지의 환경적인 요인 등에 대한 정보를 수집하여 사전 정보 조사를 수행할 계획이며 이러한 정보들은 이후 4차년도에 미생물 바이오마커 발굴을 위한 대상 미생물 균을 선별하는 과정, 적용 시험 등과 연계하여 활용하였음.

▶ 농산물 시료로부터 추출한 DNA를 활용하여 메타지노믹 시퀀스 데이터 생산 및 미생물 군집 분석

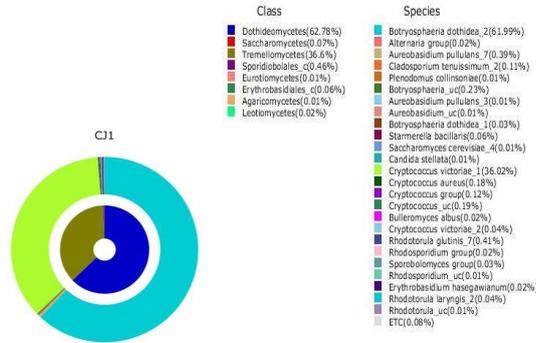
○ 메타지노믹스의 기법이 발전하게 된 계기는 2000년대 이후 차세대염기서열분석 (Next generation sequencing) 기기의 눈부신 발전과 더불어 더욱 다양한 방면에 활용되기 시작하였으며 현재는 인간의 장내 미생물 (probiotics) 군집분석, 다양한 환경에서의 미생물과 환경과의 상호관계, 기주 동식물과 미생물의 관계 등에서 자연현상 규명을 위한 tool로 활용되고 있음.



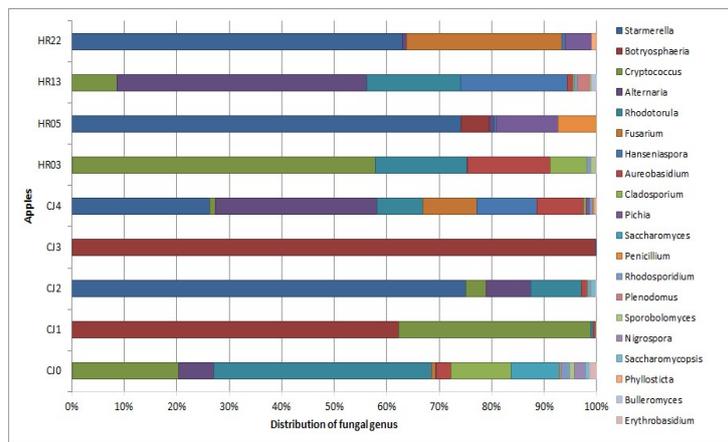
○ 기본적인 메타지노믹스의 파이프라인은 아래와 같이 시료수집에서 DNA추출 후 세균, 진균의 미생물군의 16S rDNA, 5.8S rDNA-ITS region을 PCR (Polymerase Chain Reaction)로 증폭하여 수많은 미생물군집의 증폭된 DNA fragment의 sequence를 확보하고 1차 군집 분석을 통하여 어떤 미생물 군들이 시료에 존재하는지를 종 (species), 속 (genus), 과 (family), 강 (class), 문 (phylum) 등의 taxonomy 체계에 따라 분류하였음.



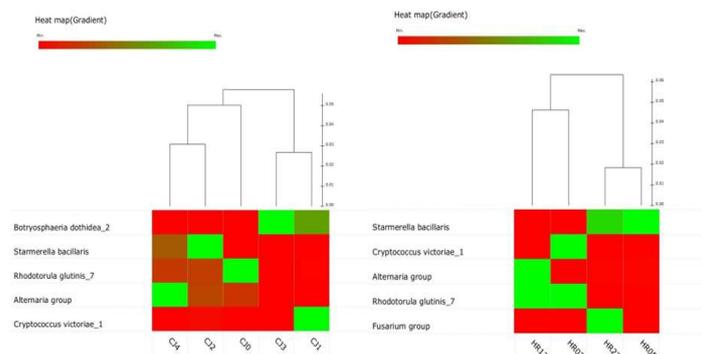
○ 특정 시료로부터 분리한 미생물 genomic DNA의 메타지놈 시퀀스 결과로 생성되는 1차 분석의 결과들은 NGS 시퀀싱 서비스 회사에서 시퀀스 raw data로 가공해 주는 데이터로 아래와 같은 형태들이 있는데 각 미생물 군집을 어떤 분류체계로 나타낼 것인가에 따라 안쪽 circle과 바깥 쪽 circle을 다른 분류체계로 visualization시킬 수 있음.



○ 또한 시료에서 차지하는 각 미생물 군의 abundance의 상대적인 비교는 아래와 같은 도식으로 비교 분석이 가능하며 원산지가 다른 농산물 시료의 미생물 군집 분석 결과를 아래와 같이 분석할 경우 1차 분석에서 동일한 미생물 군은 제외하고 상이한 미생물 군집을 선별해 내는 것은 어렵지 않을 것으로 판단됨.



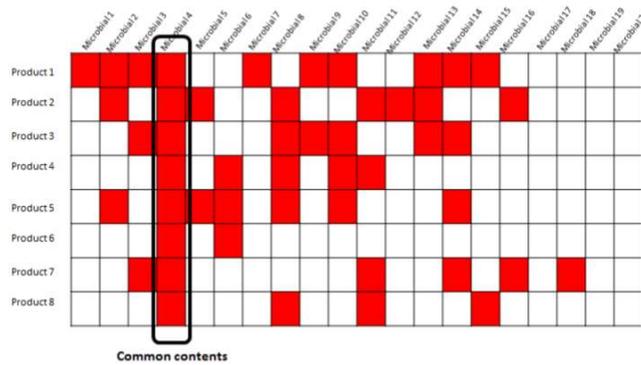
○ 미생물의 군집 구성을 기반으로 시료간의 Unifrac clustering을 하면 아래와 같은 도식으로도 분석이 가능하며 heatmap gradient에 따라 각 미생물 군집의 상대적인 양을 표시할 수 있음.



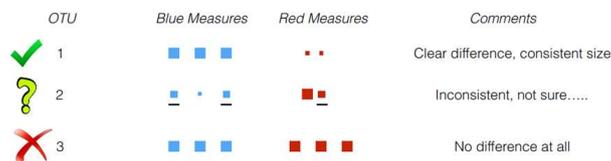
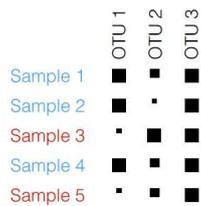
○ NGS 시퀀싱 서비스회사에서 의뢰한 gDNA로 시퀀싱 후 1차적인 미생물 군집 분석이 가능한데, 본 연구에서는 1차 분석결과를 활용하여 원산지가 서로 다른 농산물을 차별화할 수 있는 미생물 군을 선별해 내는 전략이 필요함

▶ 원산지 별 농산물 시료의 차별화된 상이한 미생물 군 선별 및 바이오마커 탐색

○ 메타지놈 분석을 통하여 공통적이고 특이적인 미생물 군집을 바코드화하여 아래와 같이 diversity를 분석하고 판별할 수 있음. 미생물 군집의 분류 단위를 종(species)로 할 수 있고 원산지에 따라 차별화되는 분류군에 따라 바이오마커를 탐색하는 범위는 달라질 수 있음.



○ 바이오마커 후보군을 탐색하는 전략은 아래와 같이 OTU3은 시료간 차별화 되지 않는 군집이고 OTU2는 시료 별 차이가 뚜렷하지 않아 차별성을 확신할 수 없으며 가장 적절한 바이오마커는 OTU1과 같이 시료별 차이가 명확한 것임. 따라서 OTU1과 같이 원산지 별로 뚜렷이 구별이 되는 미생물 군 또는 특정 유전자군을 발굴해 내는 것이 이상적일 것임.



▶ 본 연구에서의 차별화된 연구 전략 및 계획

- 원산지를 판별할 수 있는 미생물 군을 선별한 후 특정 미생물군 (중 또는 강 수준의 분류)에서 특이 유전자를 탐색하여 바이오마커로 활용 가능성을 모색하는 것은 현재까지 문헌 조사를 통하여 볼 수 없었던 전략임.
 - 메타지놈 시퀀스를 활용하여 바이오마커를 발굴하고자 하는 시도는 인간의 질병 진단을 위한 마커발굴을 위해 메타지놈 시퀀스로부터 차별화되는 미생물 군집을 필터링해 내는 프로그램 개발 내용이었고 바이오마커를 발굴해 내는 연구들은 주로 대상 질병의 환자의 시료를 분석하여 특이한 SNP를 발견하는 내용으로 활발히 진행 중임.
- 본 연구에서는 농산물 별로 기주 특이성을 가지는 진균류를 선택배지를 사용하여 분리, 동정하고 동종의 농산물에서 원산지가 다른 시료로부터 차별화되는 진균류, 내생균류가 발견될 시 해당 진균 종을 선별해 낼 수 있는 특이 유전자를 탐색하여 바이오마커로의 활용 가능성을 시험해 볼 계획임.
- 메타지놈 시퀀스의 분석은 homology search based의 analysis인데 현재 개발되어 활용되고 있는 프로그램이나 방법들이 정형화 되어 있지 않고 다양한 분야에서 다양한 목적으로 분석이 됨에 따라 본 연구에서 필요로 하는 방향으로 기존의 tool을 수정, 보완한 새로운 tool이나 프로그램을 개발할 가능성도 두고 있음.
- 또한 메타지놈의 raw data는 시퀀스 read가 매우 많은 편이라 일반적인 서버에서 분석이 어려운 경우가 많으므로 필요 시 메타지놈 시퀀스 프로파일링을 위한 IT 인프라를 구축해야 할 것임.

나. 추진체계

▶ 국내외 유관기관과의 유기적인 협력 시스템을 통한 연구 추진

- 본 연구팀은 대사체 지문 분석 및 데이터 통합관련 주관연구기관(이화여자대학교, 국민대학교, 중앙대학교) 및 메타제노믹스 분석 관련 협동연구기관(숭실대학교, 서울대학교)로 구성되어 있음. 위탁기관으로 국립농산물품질관리원이 참여하여 농산물 시료수집 및 보관과 본 과제에서 얻어진 원산지 판별법을 실제 단속에 적용하는 것으로 협력 시스템이 구성되어 있음.
- 시료 수집, 전처리, 보관에서부터 시료의 대사체 및 메타제노믹스 분석은 물론, 얻어진 데이터의 프라세싱 및 통합관리까지 이어지는 유기적인 협력 체계를 이루고 있음.
- 외부 협력기관으로 대사체학 분야의 국제적인 선도연구 그룹인 미국 **University of California, Davis의 Dr. Fiehn 연구팀**이 참여하여 연구 전반에 대한 자문 및 국제동향에 대한 정보를 제공해줄 것임. 또한, 데이터 프라세싱 및 라이브러리 구축에도 공동연구를 진행하겠음.

▶ 연구개발 최종목표의 달성을 위한 기관별 연구개발 추진체계도

- 각 연구팀이 수행하는 연구내용과 결과들은 연관된 연구팀에 제공되고 데이터 또는 DB 구축 후 농산물 원산지 단속에 실제 활용을 궁극적 목표로 연구개발을 진행하며, 각 연구팀은 상호 유기적 관계를 바탕으로 연구를 수행하고자 함.
- 주관연구기관(이화여자대학교)과 위탁연구기관(국립농산물품질관리원)이 협력하여 농산물 시료 선정, 수집, 보관과 관련된 시료 전처리 방법을 확립하고, 공동연구기관1, 공동연구기관2과 함께 다양한 분석기기[NMR, GC-MS(quadropole, TOF), LC-MS/MS(QTOF, Orbitrap)]를 활용하여 농산물 내 전대사체를 분석하고 대사체 DB를 구축, 원산지 판별에 관여하는 바이오마커를 선정, 이를 활용하는 예측모델 확립함.
- 주관연구기관과 공동연구기관 2,3 연구팀에 의해 분석된 결과는 협동연구기관(숭실대학교, 서울대학교)에 제공하여 원산지에 따른 대사체/수확시기에 따른 대사체 및 연계변수(환경요인, 유전요인)와의 상관관계를 규명함.
- 각 연구팀에서 얻어진 데이터, 데이터 처리방법 및 검증모델을 기반으로 원산지 판별을 위한 통합데이터베이스 및 네트워크를 구축 하며, 이를 통해 농산물 원산지 판별 업무를 현장에서 담당하는 정부기관에서 농산물 원산지 단속에 실제 활용하고자 함.



그림 13. 연구개발 최종목표의 달성을 위한 기관별 연구개발 추진체계도

▶ 연구개발 최종목표의 달성을 위한 연구내용 및 방법 체계도

대사체 지문 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용



그림14. 연구개발 최종목표의 달성을 위한 연구내용 및 방법 체계도

2-2. 연구내용 및 연구결과

가. 주관연구기관: 이화여자대학교 식품공학과 김영석 교수

(1) 원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상농산물 선정

- 시료는 농산물품질관리원에서 자체적으로 실시한 수요조사와 원산지 위변조 사례 및 국내 생산/유통/수입되는 각 농산물 총량 (농림축산식품부 통계자료, 식물검역 통계자료, 관세청 통계자료 참조) 등을 근거로 대두, 참깨, 쌀을 선정하였다.
- 현재 우리나라의 대두 소비는 대부분 수입에 의존하고 있다. 2015년 농림축산식품부에서 발표한 농림수산물 수출입 동향 및 통계자료에 따르면 농림수산물 중 대두의 수입량이 10위 내에 위치하였다. 또한 두류 중 대두의 수입량이 대부분을 차지하였고, 주요수입국은 브라질, 미국, 중국 등이었다.
- 참깨는 국내에 유통/소비/수입되는 양이 많고, 우리나라 농산물 중 원산지 위변조 사례가 많은 것 중 하나이다.
- 통계청에서 실시한 2015년 양곡소비량조사 결과에 따르면 1인당 연간 쌀 소비량은 62.9kg으로 소비량이 많은 농산물 중 하나이며, 우리나라 주식으로 의미가 있다.

(2) 대두의 휘발성 대사체 추출법 및 분석법 확립

(가) 시료 준비

- 대두의 휘발성 대사체 분석 방법을 연구할 위해 국내산 대두 (백태)를 구입하여 예비실험을 진행하였다.



그림 15. 국내산 대두 시료

- 휘발성 대사체의 효과적인 추출을 위하여 선행된 연구논문을 조사하였다.

- 휘발성 성분의 release와 흡착을 향상시키기 위해 sodium chloride를 첨가하여 slurry 형태로 만드는 전처리 과정을 거친 후 휘발성 성분을 분석하였다 (ANNE-CHRISTELLE J. CRAMER et al., 2005).
- 시료를 분석하는 동안에는 화학적인 변화가 일어나지 않도록 억제시키는 과정도 필요하다. 5M 이상의 calcium chloride 용액을 이용하면 효소 반응을 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 headspace 상으로 휘발성 성분이 포집되는 것도 용이하게 한다 (Wolfram Weckwerth, 2007).

① 5가지 전처리 방법

- 다양한 선행연구를 참조하여 총 5가지의 전처리 방법을 시행하였다.

㉠ Raw soybean

아무 전처리를 하지 않은 시료로, 날 것 그대로를 이용하였다. 20mL screw vial에 시료를 7g 넣고 screw cap (Ultraclean 18mm, Agilent technologies, DE, Germany)으로 막았다.

㉡ Ground soybean

대두 7g을 믹서기로 1분 동안 간 후, 20mL screw vial에 5g을 넣고 Screw cap으로 막았다.

㉢ Soybean slurry

대두 5g을 믹서기로 1분 동안 갈아 준비한다. 100mL 삼각플라스크에 간 대두 3.6g과 sodium chloride 3.6g, 3차 증류수 14.8mL를 넣고 20분 동안 stirring 하였다. 이 중 5g을 채취하여 20mL screw vial에 넣고 screw cap으로 닫았다.

㉣ Using calcium chloride

250mL duran 병에 6M의 calcium chloride 용액을 만든 후 대두를 10분 담근다. 20mL screw vial에 7g을 넣고 screw cap으로 막았다.

㉤ Ground soybean in distilled water

대두 5g을 믹서기로 1분 동안 갈고, 100mL 삼각플라스크에 증류수 14.8mL와 간 대두 3.6g을 넣고 20분 동안 stirring 하였다. 이 중 5g을 채취하여 20mL screw vial에 넣고 screw cap으로 닫았다.

② 액체 질소와 calcium chloride를 이용한 전처리

- 앞서 실행한 5가지 전처리 방법을 바탕으로, 대두의 효과적인 grinding과 효소반응 억제를 위하여 액체 질소와 calcium chloride를 이용하는 방법을 실시하였다.

㉦ Freeze grinding and using calcium chloride

액체 질소에 대두 6g을 1분 동안 담가 급속 냉동시킨 후, 1분 동안 grinding 하였다. 효소 비활성화를 위하여 20mL screw vial에 freeze grinding한 대두 5g에 6M calcium chloride 용액 5mL를 넣고 vortexing하였다.

(나) 대두 휘발성 대사체의 Solid Phase Micro-Extraction (SPME)를 이용한 추출 방법 및 GC/MS 분석 방법

① 5가지 전처리 방법에 따른 SPME 및 GC/MS 분석 방법

- SPME 방법

- SPME는 시료를 일정한 온도로 유지시켜 headspace 상으로 휘발성 성분을 이동시키고 이를 polymer로 코팅된 fiber를 이용하여 추출하는 방법으로, 비교적 적은 양의 시료도 분석 가능한 방법으로 알려져 있다 (Lee et al., 1999).
- 20mL screw vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20mL screw vial을 250RPM, 40°C에서 60분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 20분간 흡착하였다. 그리고 230°C에서 5분간 유지하며 휘발성 성분을 탈착시켰다.

- GC/MS 분석 방법

- SPME법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기성분은 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-Wax (30m length×0.25mm I.D.×0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였으며, Oven은 40°C에서 6분간 유지하였고, 200°C까지 4°C/min으로 온도를 높인 후 5분간 머물렀다.
- 이동상 기체로는 helium을 0.8mL/min로 이용하였고, splitless모드로 설정하였다. 그리고 mass spectra ionization energy는 70eV였고, mass scan range는 35-350 a.m.u였다.

② 액체 질소와 calcium chloride를 이용한 전처리 방법에 따른 SPME 및 GC/MS 분석 방법

- SPME 방법

- SPME는 시료를 일정한 온도로 유지시켜 headspace 상으로 휘발성 성분을 이동시키고 이를 polymer로 코팅된 fiber를 이용하여 추출하는 방법으로, 비교적 적은 양의 시료도 분석 가능한 방법으로 알려져 있다 (Lee et al., 1999).
- 20mL screw vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20mL screw vial을 250RPM, 40°C에서 30분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 20분간 흡착하였다. 그리고 230°C에서 5분간 유지하며 휘발성 성분을 탈착시켰다.

- GC/MS 분석 방법

- SPME법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기성분은 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-Wax (30m length×0.25mm I.D.×0.25 μ m film thickness, J&W Scientific)를 사용하였으며, Oven은 40°C에서 6분간 유지하였고, 200°C까지 4°C/min으로 온도를 높인 후 5분간 머물렀다.
- 이동상 기체로는 helium을 0.8mL/min로 이용하였고, splitless모드로 설정하였다. 그리고 mass spectra ionization energy는 70eV였고, mass scan range는 35-350 a.m.u였다.
- 시료의 재현성 확인을 위하여 6반복하여 측정하였다.

(다) 대두 휘발성 대사체의 동정 및 정량 방법

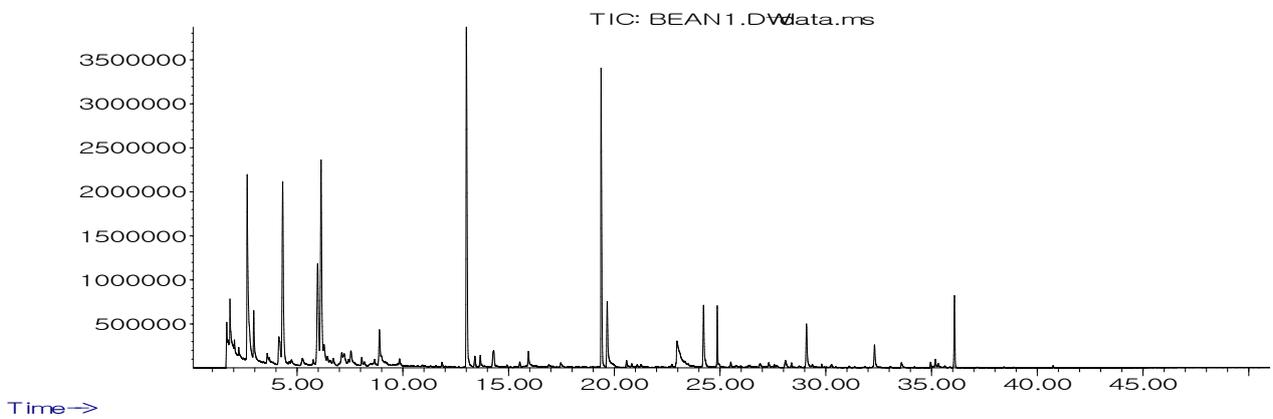
- SPME법으로 추출한 휘발성 향기성분의 동정은 mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다. Hexane에 희석한 saturated alkanes (100ppm in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 Retention Index (RI)를 구한 후 문헌상의 RI값과 비교하였고, 분석된 모든 휘발성 화합물의 피크 면적에서 각 화합물이 차지하는 피크 면적의 비율 (%)을 구하여 정량하였다.

(라) 실험 결과

① 5가지 전처리 방법

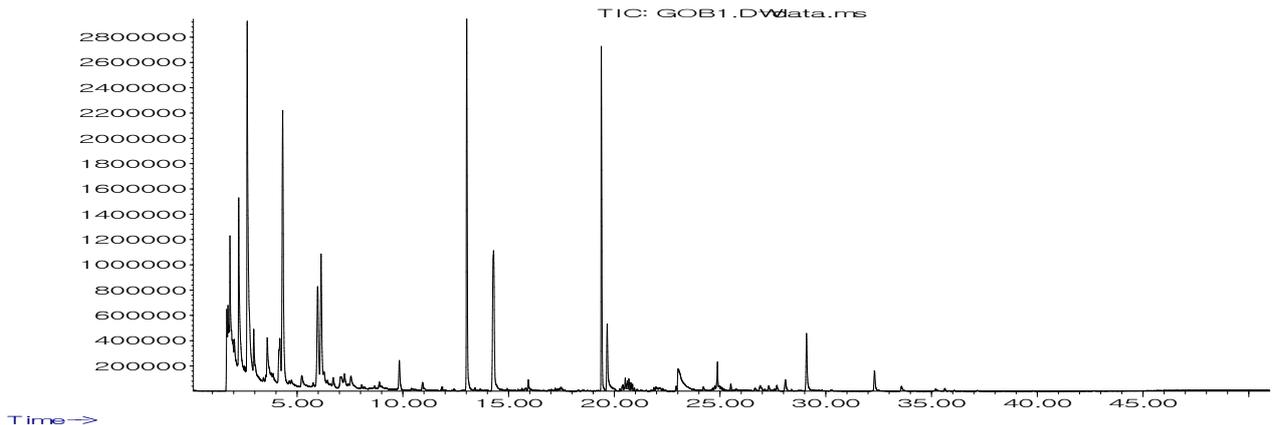
(a)

Abundance



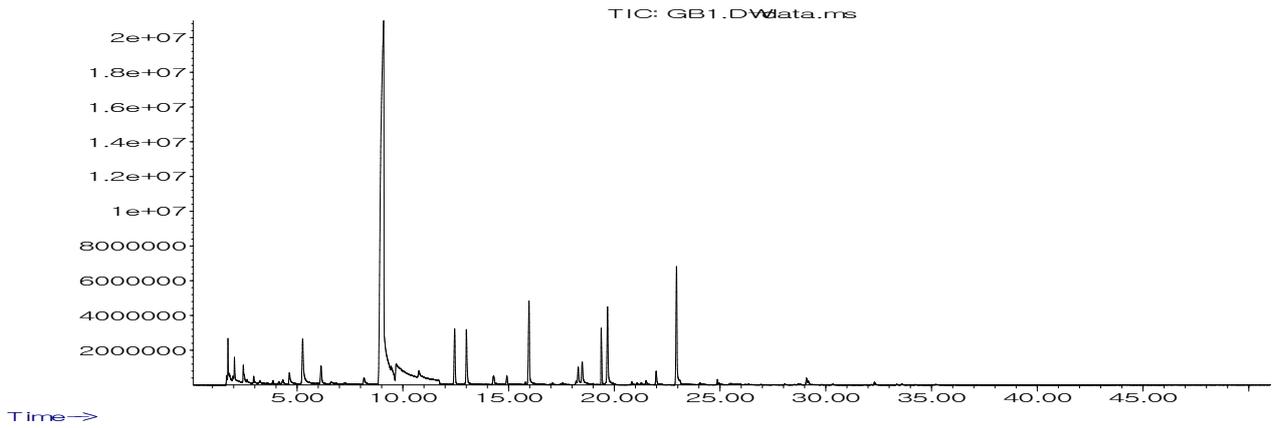
(b)

Abundance



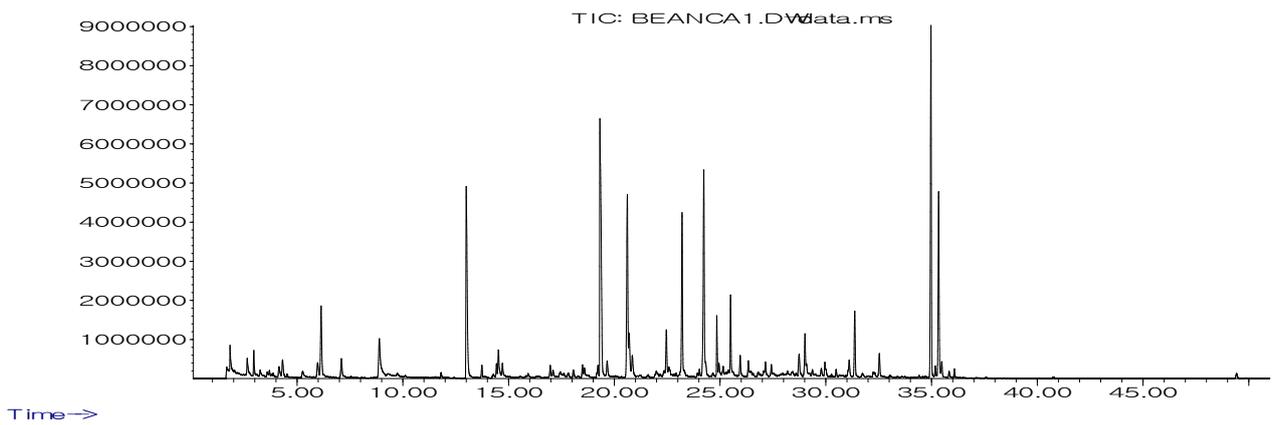
(c)

Abundance



(d)

Abundance



(e)

Abundance

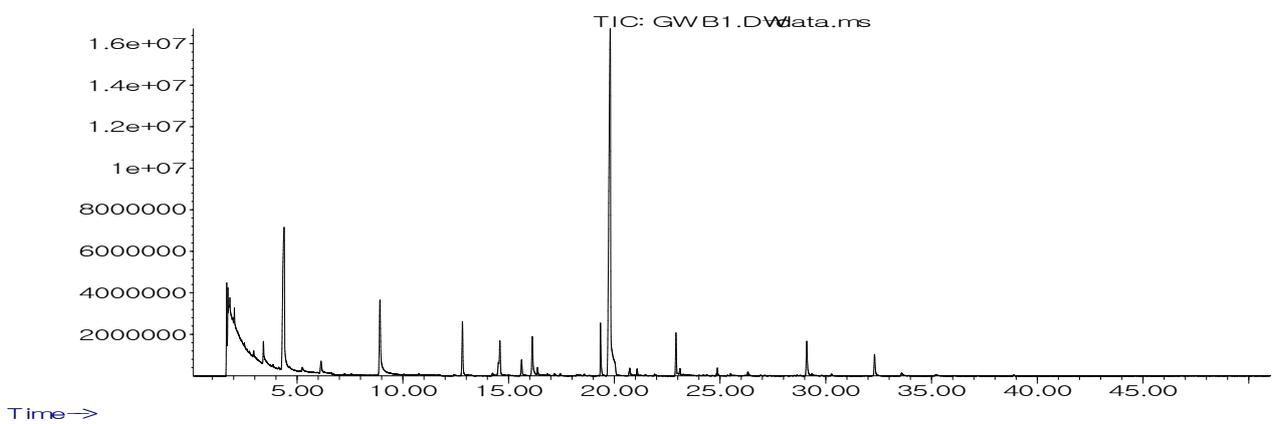


그림 16. GC/MS를 이용한 대두의 휘발성 대사체 total ion chromatogram; (a) Raw soybean, (b) Ground soybean, (c) Soybean slurry, (d) Using calcium chloride, (e) Ground soybean in distilled water

- 전처리 방법은 날 것 그대로의 대두 (BEAN), slurry 형태의 대두 (GB), grinding한 대두 (GOB), grinding 후 증류수와 섞은 대두 (GWB), sodium chloride를 첨가한 대두 (BEANCA)로 총 5가지이며, GC/MS를 이용하여 측정된 대두의 휘발성 성분의 분석 결과는 아래 표 5과 같다.
- 대두를 분석한 결과 Acid류는 1종, Alcohol류는 34종, Aldehyde류는 21종, Benzene류는 1종, Ester류는 11종, Furan & Furfural류는 4종, Hydrocarbon류는 17종, Ketone류는 23종, 질소 함유한 화합물은 5종, Phenol류는 4종, 황을 함유한 화합물은 1종, Terpene류는 3종으로 총 125개의 성분이 동정되었다.
- 각 전처리 별로 많이 검출된 성분을 위주로 살펴보면, 날 대두의 경우 propan-2-one이 가장 큰 peak area (%)를 나타냈고, ethanol, acetonitrile, 2-ethylhexan-1-ol, hexan-1-ol 순으로 많이 동정되었다. 대두를 갈아서 휘발성 성분을 확인한 경우에도 역시 propan-2-one이 가장 많이 검출되었으며, ethanol, 3-methyl-1-butanol, methylsulfanylmethane, hexan-1-ol, acetonitrile 순으로 분석되었고, 날 대두와 비슷한 양상을 보였다. Slurry 형태의 대두는 hexanal이 압도적으로 많이 분석되었으며, grinding 후 증류수와 섞은 대두는 hexan-1-ol이 제일 많은 양을 차지하였고, hexanal이 그 뒤를 이었다. 대두에 존재하는 lipoxygenase가 linoleic acid의 분해 반응을 촉진하여 hexanal의 생성이 급격히 증가한 것으로 보인다 (Hildebrand, D. F., 1989). Calcium chloride에 담가 둔 대두는 ester류의 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate가 가장 많이 동정되었고, 2-ethylhexyl acetate가 그 다음으로 많이 분석되었다.

표 5. 대두 전처리별 휘발성 대사체 성분 분석

No.	RI ^{a)}	Volatile Compounds	Relative Peak Area ^{b)} (%)				
			BEAN	GB	GOB	GWB	BEANCA
Acids							
1	1456	Acetic acid	5.767	0.000	0.437	0.000	0.000
Alcohols							
2	906	2-Methylpropan-2-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.176
3	926	2-Propanol	0.722	0.000	0.000	0.000	0.000
4	932	Ethanol	15.930	0.000	16.253	19.861	1.002
5	971	Cyclopentanol	0.000	0.000	0.000	0.467	0.000
6	1030	Lithium trimethyl-oxidosilane	0.000	0.000	0.000	0.000	1.226
7	1043	Propan-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.114	0.000
8	1103	2-Methylpropan-1-ol	0.573	0.000	1.761	0.000	0.000
9	1109	2-Methylpentan-2-ol	0.000	0.202	0.291	0.000	0.079
10	1129	Pentan-2-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	1151	Butan-1-ol	0.402	0.030	0.252	0.000	0.000
12	1166	Pent-1-en-3-ol	0.000	2.710	0.000	0.000	0.000
13	1211	Pentan-1-ol	0.968	5.014	0.877	0.250	0.323
14	1212	3-Methylbutan-1-ol	1.802	0.036	11.104	3.370	0.000
15	1227	2-Methyl-1-butanol	0.000	0.000	0.000	0.501	0.000
16	1299	Heptan-3-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109
17	1324	(Z)-Pent-2-en-1-ol	0.000	1.163	0.000	0.000	0.000
18	1343	2-Methylcyclopentan-1-ol	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000
19	1358	Hexan-1-ol	5.229	5.610	7.473	42.106	0.720
20	1388	(Z)-Hex-3-en-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.635	0.000
21	1398	6-Methylheptan-3-ol	0.000	0.000	0.039	0.000	0.000
22	1398	Octan-3-ol	0.000	0.060	0.092	0.404	0.000
23	1403	2-Butoxyethanol	0.231	0.000	0.000	0.000	0.000
24	1410	(E)-Hex-2-en-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.066	0.000
25	1455	Oct-1-en-3-ol	0.000	6.132	0.000	2.637	0.000
26	1460	Heptan-1-ol	0.000	0.071	0.000	0.395	0.000
27	1463	5-Methylnonan-5-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	7.288
28	1494	2-Ethylhexan-1-ol	5.418	0.051	0.184	0.030	0.000
29	1498	(Z)-Hept-4-en-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
30	1498	(4E)-4-Hepten-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000
31	1563	Octan-1-ol	0.000	0.056	0.000	0.207	0.591
32	1594	Propane-1,2-diol	0.187	0.000	0.464	0.000	0.000
33	1665	Nonan-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.028	0.284
34	1766	Decan-1-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.104
35	1797	2-(2-Butoxyethoxy)ethanol	0.073	0.000	0.000	0.000	0.000
Aldehydes							

36	<800	Acetaldehyde	0.000	0.647	0.000	0.000	0.000
37	796	Propanal	0.000	0.386	0.000	0.000	0.000
38	871	Butanal	0.000	0.106	0.000	0.000	0.367
39	913	3-Methylbutanal	0.000	0.127	0.000	0.147	0.116
40	913	Pentanal	0.055	3.596	0.138	0.000	0.928
41	945	Hexa-2,4-dienal	0.000	0.000	0.135	0.000	0.000
42	1078	Hexanal	1.645	65.302	0.369	7.946	0.000
43	1125	(E)-Pent-2-enal	0.000	0.195	0.209	0.000	0.000
44	1211	(E)-Hex-2-enal	0.000	0.180	0.000	0.087	0.000
45	1230	4-Hydroxynonanal	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000
46	1285	Octanal	0.000	0.097	0.000	0.000	0.298
47	1312	3-Ethylheptanal	0.000	0.000	0.000	0.000	0.514
48	1318	(E)-Hept-2-enal	0.000	0.992	0.000	0.000	0.000
49	1391	Nonanal	0.174	0.176	0.000	0.000	0.949
50	1426	(E)-Oct-2-enal	0.000	0.887	0.000	0.106	0.000
51	1489	(2E,4E)-Hepta-2,4-dienal	0.000	0.119	0.000	0.000	0.000
52	1517	Benzaldehyde	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
53	1640	(E)-Dec-2-enal	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000
54	1699	(2E,4E)-Nona-2,4-dienal	0.000	0.049	0.000	0.000	0.000
55	1762	(2E,4Z)-Deca-2,4-dienal	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
56	1809	(2E,4E)-Deca-2,4-dienal	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
Benzenes & Benzene Derivatives							
57	1035	Methylbenzene	0.000	0.102	0.000	0.129	0.000
Esters							
58	886	Ethyl acetate	0.000	0.000	0.159	2.735	0.000
59	1266	Hexyl acetate	0.000	0.000	0.000	0.488	0.000
60	1352	Trimethylsilyl 2-bis(trimethylsilyloxy) phosphorylacetate	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000
61	1384	2-Ethylhexyl acetate	0.531	0.000	1.421	0.000	8.480
62	1414	2-Methylpropyl 2-ethylhexanoate	0.000	0.000	0.000	0.000	0.234
63	1448	2-Ethyl-1-hexyl propionate	0.231	0.000	0.000	0.000	0.000
64	1869	Butyl butanoate	0.385	0.000	0.000	0.000	0.000
65	1870	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	0.000	0.000	0.000	0.000	17.247
66	1878	[2,2,4-Trimethyl-1-(2-methylpropanoyloxy)pentan-3-yl]2-methylpropanoate	0.614	0.000	0.000	0.000	0.455
67	1884	(1-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentan-3-yl) 2-methylpropanoate	0.259	0.000	0.000	0.000	9.609
68	1978	Diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
Furans & Furfurals							
69	865	3-Methylfuran	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
70	896	2-Methylfuran	0.000	0.000	0.090	0.000	0.000
71	945	2-Ethylfuran	0.138	0.905	0.000	0.000	0.000

72	1228	2-Pentylfuran	0.076	0.534	0.166	0.000	0.027
Hydrocarbons							
73	<800	Pentane	0.000	0.825	0.000	1.067	0.000
74	<800	(Z)-Pent-2-ene	0.000	0.054	0.000	0.000	0.000
75	<800	Hexane	2.429	0.000	2.160	0.000	1.188
76	<800	(3Z)-Penta-1,3-diene	0.000	0.097	0.000	0.000	0.000
77	924	Dichloromethane	1.373	0.312	0.000	0.089	0.360
78	949	2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	0.557	0.000	0.175	0.000	0.000
79	1013	Icosane	0.960	0.000	0.000	0.000	0.000
80	1016	4,7,7-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-ene	0.228	0.000	0.049	0.000	0.000
81	1020	Chloroform	0.508	0.000	0.440	0.042	0.049
82	1196	Dodecane	0.709	0.000	0.079	0.000	0.668
83	1398	Tetradecane	0.195	0.000	0.000	0.000	0.000
84	1411	(3E)-3-Ethyl-2-methylhexa-1,3-diene	0.000	0.309	0.000	0.000	0.000
85	1507	1-Methylcyclohexene	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
86	1565	1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene	0.352	0.000	0.031	0.000	0.000
87	1567	3,5-Octadien-2-one	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
88	1665	Non-1-ene	0.077	0.000	0.000	0.044	0.000
89	1895	Methylsulfonylmethane	0.127	0.000	0.171	0.000	0.000
Ketones							
90	813	Propan-2-one	18.466	0.107	20.831	0.000	1.110
91	901	Butan-2-one	0.536	0.053	1.902	0.000	0.175
92	941	3,3-Dimethylbutan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.162
93	970	Pentan-2-one	0.000	0.000	0.744	0.000	0.000
94	1059	Pentane-2,3-dione	0.000	0.540	0.000	0.000	0.000
95	1078	Hexan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	3.469
96	1223	Octan-4-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.648
97	1246	Octan-3-one	0.000	0.150	0.000	1.071	0.065
98	1278	Octan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.130	0.591
99	1280	3-Hydroxybutan-2-one	0.146	0.000	0.000	0.000	0.000
100	1298	1-Octen-3-one	0.000	0.130	0.000	0.000	0.000
101	1404	(E)-Oct-3-en-2-one	0.000	0.136	0.000	0.000	0.000
102	1598	Undecan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.404
103	1603	5-Methyloxolan-2-one	0.147	0.000	0.063	0.000	0.000
104	1607	4-Methyloxolan-2-one	0.130	0.000	0.289	0.000	0.000
105	1621	Oxolan-2-one	0.817	0.000	1.246	0.000	0.000
106	1646	1-Phenylethanone	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036
107	1696	5-Ethyloxolan-2-one	0.226	0.002	0.000	0.122	0.000
108	1704	Dodecan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.364
109	1810	Tridecan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060

110	1920	1-(4-Tert-Butylphenyl)propan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019
111	1922	(5S)-5-Pentylloxolan-2-one	0.000	0.000	0.000	0.075	0.000
112	1997	Di(phenyl)methanone	0.000	0.000	0.000	0.000	0.362

N-Containing Compounds

113	1001	Acetonitrile	9.212	0.049	6.508	0.000	0.910
114	1215	1-(2-Aminophenyl)ethanone oxime	0.000	0.000	0.000	0.000	0.423
115	1559	Cyclohex-3-ene-1-carbonitrile	0.046	0.000	0.000	0.000	0.016
116	1769	Methoxyphenyloxime	1.816	0.853	1.045	3.324	0.087
117	1901	2-(Indol-2-yl)hexa-2,4-dienenitrile	0.000	0.000	0.000	0.000	0.154

Phenols

118	1902	2-Phenylethanol	0.000	0.008	0.044	0.019	0.000
119	1902	2,6-Ditert-butyl-4-methylphenol	3.567	0.000	0.000	0.000	0.458
120	1919	Phenol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022
121	2000	3,5-Ditert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040

S-Containing Compounds

122	<800	Methylsulfanylmethane	0.561	0.000	8.713	0.000	0.024
-----	------	-----------------------	-------	-------	-------	-------	-------

Terpenes

123	1156	l-Phellandrene	0.072	0.000	0.000	0.000	0.004
124	1189	dl-Limonene	1.056	0.000	0.130	0.000	0.000
125	1198	Sabinene	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000

BEAN: Raw soybean, GB: Soybean slurry, GOB: Ground soybean, GWB: Ground soybean in distilled water, BEANCA: Using calcium chloride

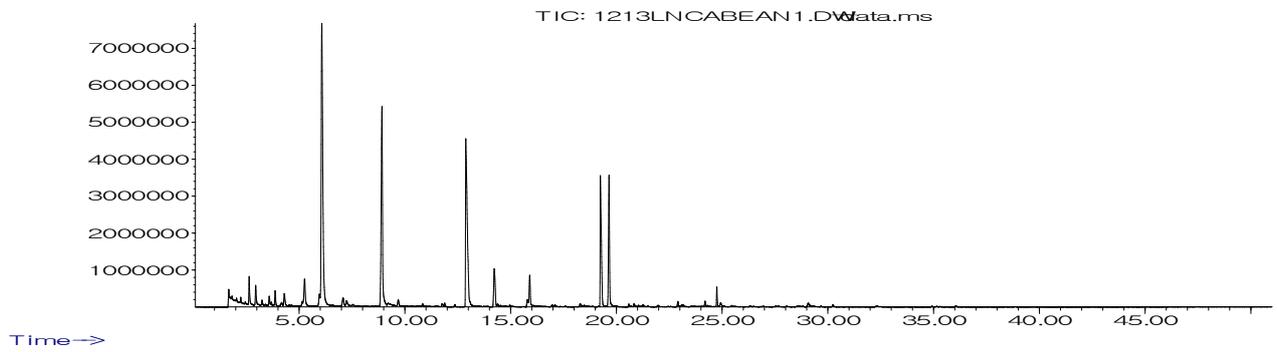
a) Retention indices were determined using 100 ppm saturated alkanes diluted by hexane C8~C16 as external references.

b) Average of relative peak areas.

① 액체 질소 및 calcium chloride 이용

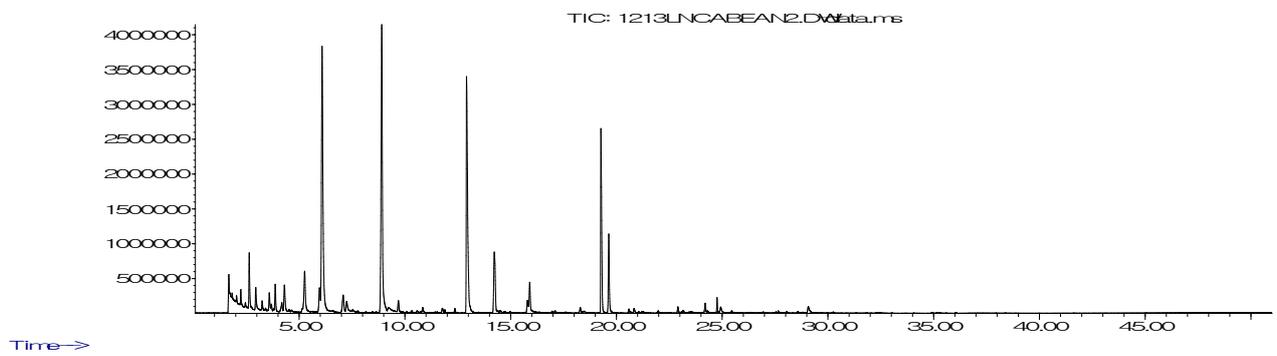
(a)

Abundance



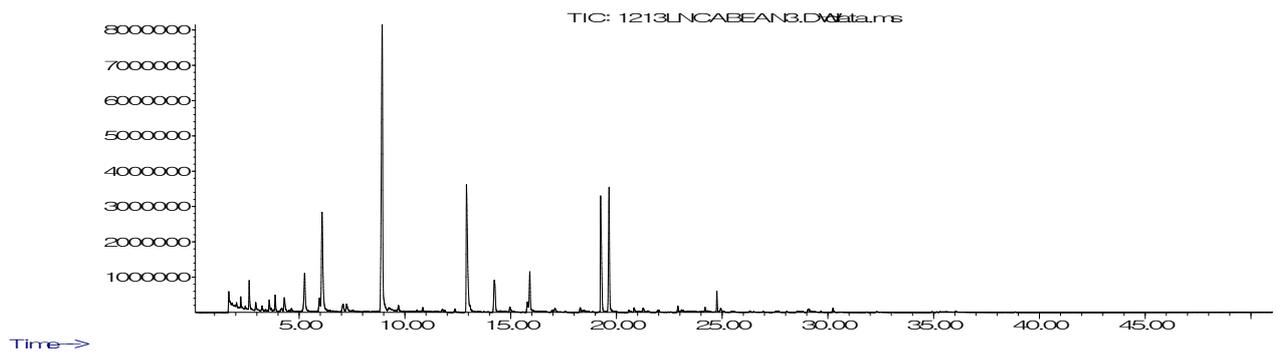
(b)

Abundance

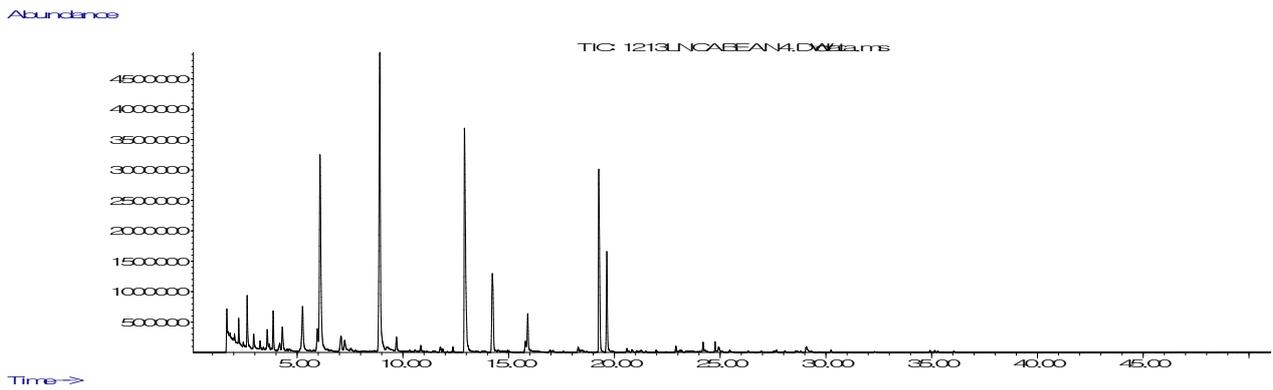


(c)

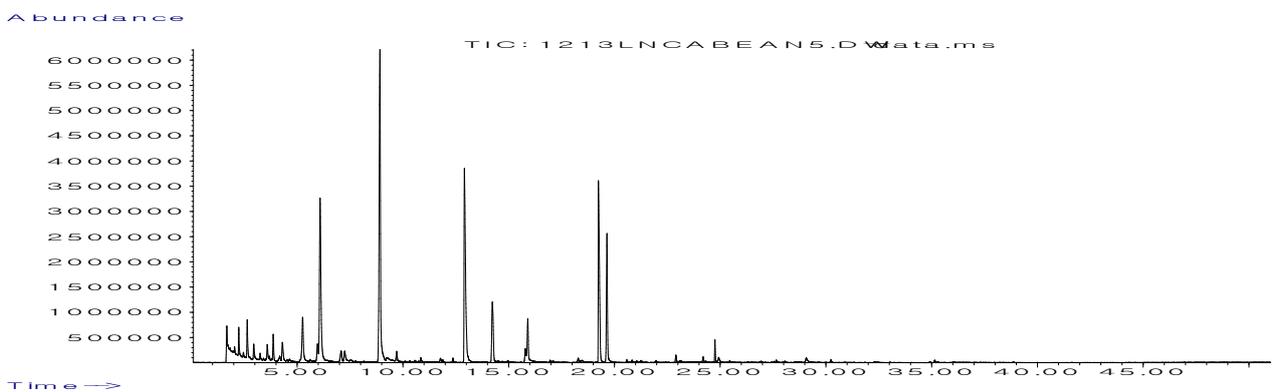
Abundance



(d)



(e)



(f)

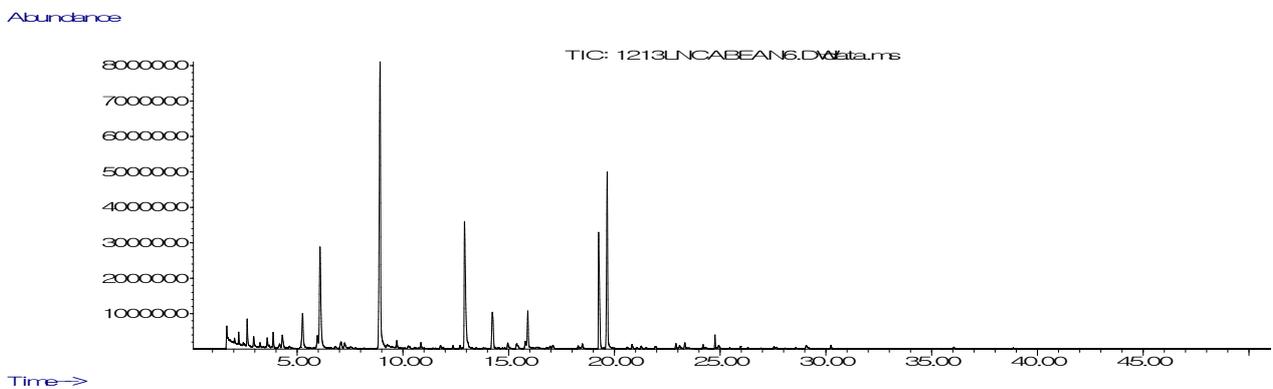


그림 17. GC/MS를 이용하여 6반복 측정된 대두의 휘발성 대사체 total ion chromatogram

- 액체 질소를 이용하여 freeze grinding 한 후 calcium chloride를 함께 섞어 휘발성 대사체를 분석한 결과는 다음 표 6와 같다.
- 대두를 분석한 결과 Acid류는 1종, Alcohol류는 36종, Aldehyde류는 12종, Benzene류는 1종, Ester류는 3종, Furan & Furfural류는 4종, Hydrocarbon류는 18종, Ketone류는 14종, 질소 함유한 화합물은 1종, 황을 함유한 화합물은 3종, Terpene류는 2종으로 총 73개의 성분이 동정되었다.
- 6 반복하여 측정한 결과를 살펴보면 Hexanal이 가장 많이 검출되었음을 확인할 수 있다.

표 6. 대두의 휘발성 대사체 성분 분석

No.	RI	Volatile Compounds	Relative Peak Area ^(a) (%)					
			Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6
Acids								
1	1471	Acetic acid	0.014	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000
Alcohols								
2	905	2-Methylpropan-2-ol	0.160	0.235	0.122	0.186	0.132	0.095
3	925	Propan-2-ol	0.358	0.630	0.377	0.531	0.377	0.377
4	931	Ethanol	1.203	1.981	1.521	1.655	1.428	1.252
5	1040	Propan-1-ol	0.175	0.193	0.168	0.081	0.010	0.153
6	1096	2-Methylpropan-1-ol	0.591	0.786	0.542	0.887	0.657	0.575
7	1106	5-Methylhexan-3-ol	0.030	0.048	0.033	0.035	0.000	0.000
8	1106	2-Methylpentan-2-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000
9	1111	Pentan-3-ol	0.070	0.109	0.072	0.090	0.079	0.000
10	1124	Pentan-2-ol	0.217	0.337	0.374	0.384	0.268	0.445
11	1147	Butan-1-ol	0.270	0.346	0.286	0.320	0.263	0.265
12	1162	Pent-1-en-3-ol	0.185	0.282	0.308	0.299	0.282	0.240
13	1208	2-Methylbutan-1-ol	4.559	5.901	4.459	7.113	5.669	4.219
14	1253	Pentan-1-ol	2.274	1.551	3.190	1.970	2.318	2.549
15	1297	Heptan-3-ol	0.051	0.075	0.006	0.052	0.046	0.045
16	1356	Hexan-1-ol	11.601	5.130	12.017	6.419	8.655	14.559
17	1396	Octan-3-ol	0.124	0.087	0.110	0.105	0.102	0.105
18	1402	(3E,5E)-3,5-Octadien-2-ol	0.232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
19	1423	Octan-2-ol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.322
20	1453	Oct-1-en-3-ol	0.440	0.416	0.531	0.376	0.470	0.413
21	1458	Heptan-1-ol	0.082	0.040	0.131	0.033	0.051	0.176
22	1460	5-Methylnonan-5-ol	0.104	0.127	0.059	0.085	0.072	0.000
23	1492	2-Ethylhexan-1-ol	0.412	0.558	0.367	0.540	0.315	0.277
24	1561	Octan-1-ol	0.077	0.062	0.127	0.065	0.051	0.118
25	1878	Phenylmethanol	0.044	0.044	0.039	0.000	0.000	0.053
Aldehydes								
26	870	Butanal	0.354	0.499	0.354	0.416	0.339	0.282
27	913	3-Methylbutanal	1.035	1.428	1.195	1.990	1.379	0.972
28	971	Pentanal	2.620	3.360	4.654	3.707	3.723	3.534
29	1076	Hexanal	23.399	26.414	37.994	25.736	27.150	30.756
30	1122	(E)-Pent-2-enal	0.026	0.000	0.044	0.025	0.031	0.007
31	1216	3-Methylheptanal	0.111	0.185	0.119	0.000	0.000	0.000
32	1284	Octanal	0.000	0.149	0.337	0.090	0.091	0.240
33	1317	(E)-Hept-2-enal	0.256	0.364	0.399	0.301	0.270	0.228
34	1390	Nonanal	0.268	0.340	0.453	0.175	0.161	0.382
35	1424	(E)-Oct-2-enal	0.162	0.200	0.274	0.159	0.153	0.000

36	1516	Benzaldehyde	0.336	0.435	0.417	0.397	0.392	0.333
37	1637	2-Phenylacetaldehyde	0.091	0.124	0.014	0.108	0.007	0.176
Benzenes								
38	1033	Methylbenzene	0.552	0.879	0.887	0.798	0.872	0.533
Esters								
39	886	Ethylacetate	0.085	0.128	0.097	0.113	0.087	0.073
40	1383	2-Ethylhexylacetate	0.179	0.228	0.153	0.188	0.134	0.106
41	1869	(3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	0.058	0.066	0.048	0.110	0.071	0.051
Furans & Furfurals								
42	895	2-Methylfuran	0.006	0.000	0.011	0.021	0.020	0.021
43	945	2-Ethylfuran	0.087	0.087	0.243	0.112	0.117	0.150
44	1129	2-Butylfuran	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000
45	1228	2-Pentylfuran	0.188	0.056	0.625	0.073	0.088	0.527
Hydrocarbons								
46	<800	Pentane	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030
47	<800	Hexane	0.137	0.165	0.072	0.112	0.055	0.032
48	806	2,2-Dimethylpropanal	0.012	0.000	2.032	0.000	1.837	0.000
49	1110	4-Methylidene-1-propan-2-ylcyclohexene	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109
50	1118	Ethylbenzene	0.091	0.137	0.172	0.123	0.143	0.119
51	1165	Isopropylbenzene	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000
52	1250	Ethenylbenzene	0.382	0.577	0.666	0.449	0.630	0.409
53	1409	(3E)-3-Ethyl-2-methylhexa-1,3-diene	0.000	0.000	0.140	0.041	0.035	0.080
Ketones								
54	812	Propan-2-one	1.789	2.757	0.000	2.366	0.000	1.563
55	901	Butan-2-one	0.601	0.878	0.766	0.935	0.751	0.554
56	940	3,3-Dimethylbutan-2-one	0.000	0.130	0.079	0.106	0.083	0.058
57	1046	Hexan-3-one	0.145	0.152	0.063	0.139	0.062	0.048
58	1141	2-Propan-2-ylcyclohexan-1-one	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
59	1221	Octan-4-one	0.062	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000
60	1281	Octan-2-one	0.126	0.140	0.138	0.124	0.131	0.150
61	1402	(3E)-3-Octen-2-one	0.000	0.000	0.476	0.177	0.199	0.259
62	1582	3-Methyloxolan-2-one	0.043	0.073	0.057	0.072	0.076	0.054
63	1602	5-Methyloxolan-2-one	0.000	0.066	0.070	0.070	0.062	0.141
64	1606	4-Methyloxolan-2-one	0.000	0.138	0.113	0.126	0.152	0.110
65	1620	Oxolan-2-one	0.059	0.089	0.059	0.092	0.099	0.073
66	1646	1-Phenylethanone	0.038	0.000	0.055	0.045	0.044	0.033
67	1695	5-Ethyloxolan-2-one	0.167	0.081	0.365	0.129	0.176	0.330
N-Containing Compounds								
68	1000	Acetonitrile	0.511	1.115	0.968	1.051	0.852	0.758

S-Containing Compounds								
69	<800	Methanethiol	0.034	0.045	0.038	0.060	0.050	0.039
70	<800	Methylsulfanylmethane	0.283	0.735	0.847	0.986	1.244	0.645
71	1065	Methyldisulfanylmethane	0.000	0.000	0.044	0.054	0.037	0.034
Terpenes								
72	1156	1-Phellandrene	0.000	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000
73	1189	dl-Limonene	0.030	0.038	0.048	0.060	0.027	0.058

a) Retention indices were determined using 100 ppm saturated alkanes diluted by hexane C8~C16 as external references.

(3) 원산지에 따른 대상 농산물 대두의 대사체 지문 분석

(가) 대두 전처리에 따른 특성 비교

① 시료 준비

- 2016년 경상남도 거창에서 재배한 대두를 구매하여 실험하였다.
- 시료 전처리하는 다음 5가지 방법으로 준비하였다.

- ㉠ Grinding (GRD): blender를 이용하여 간 후, 20~40 mesh sieve 사이에 걸러진 시료를 이용하였다.
- ㉡ Freeze grinding (FRG): 액체 질소로 1분간 얼린 후 ㉠의 방법과 동일하게 시행하였다.
- ㉢ Grinding with sodium chloride (GRNC): 포화 NaCl 용액과 시료를 blender로 함께 갈았다.
- ㉣ Freeze grinding and adding sodium chloride (FRNC): ㉡의 방법과 동일하게 시행한 후 포화 NaCl 수용액을 첨가하였다.
- ㉤ Blanching (BLC): 95°C 에서 6.5분간 데친 후 2)의 방법과 동일하게 시행하였다.

② 전처리별 대두의 휘발성 대사체의 Solid Phase Micro-Extraction (SPME)를 이용한 추출 방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME 방법

- SPME는 시료를 일정한 온도로 유지시켜 headspace 상으로 휘발성 성분을 이동시키고 이를 polymer로 코팅된 fiber를 이용하여 추출하는 방법으로, 비교적 적은 양의 시료도 분석 가능한 방법으로 알려져 있다 (Lee et al., 1999).
- 20 mL screw vial에 대두 시료를 3 g 넣었다. 휘발성 성분을 흡착하기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20mL screw vial을 250RPM, 40°C 에서 30분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 20분간 흡착하였다. 그리고 200°C 에서 5분간 유지하며 휘발성 성분을 탈착시켰다. 탈착과 동시에 크로마토그램의 분해능 향상을 위해 -80°C 에서 5분 동안 cryo-trapping을 실시하였다.

③ 전처리별 대두의 free fatty acids 추출 및 GC/MS 분석 방법

- Free fatty acids를 추출하기 위해 전처리별 대두 0.2 g을 준비하였다. 내부표준물질로 100 μ L of heptadecanoic acid [1 g/L (w/v) in hexane]를 이용하였다.

- 시료 0.2 g과 내부표준물질 100 μ L를 10 mL methanol, 5 mL chloroform, 2 mL distilled water와 함께 30초 동안 섞었다. 25분 동안 sonication을 한 후 (Branson 5510, Branson, Danbury, CT, USA), 원심분리기로 4°C에서 10분 간 3,500 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액 10 mL를 rotary evaporator (SB-1000, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 농축 후, 질소농축기를 이용하여 3 mL까지 농축시켰다.
- Free fatty acids를 추출하기 위해 Solid Phase Extraction (SPE) 법을 이용하였다. SPE 법을 시행하기 위해 Mega-BE NH₂ cartridge (Agilent Technologies)를 이용하였다. 5 mL chloroform으로 SPE cartridge를 activation 시킨 후, 농축된 sample을 loading 하였다. 5 mL의 chloroform : 2-propanol (2:1)을 넣어 neutral lipid를 제거하였다. 10 mL diethyl ether : acetic acid (98:2)로 free fatty acids를 얻었다. Free fatty acids는 질소농축기를 이용하여 1.5 mL까지 농축시킨 후, 2 mL e-tube (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 옮겨담았다.
- Centri-vap (Labconco Co., Kansas City, MO, USA)으로 30°C에서 하루동안 건조시킨 후, GC/MS 분석을 위한 유도체화를 진행하였다.
- 50 μ L methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL in pyridine)을 첨가한 후, 30°C에서 90분 동안 반응시켰다. 90 μ L의 N,O-bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS)을 넣고 70°C에서 30분 동안 반응시켰다.
- 추출한 free fatty acids는 direct injection으로 1 μ L 씩 주입하여 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent technologies)를 이용하여 분석하였다.
 - Column은 DB-5MS (30m length \times 0.25mm I.D. \times 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific)를 사용하였다. Oven은 80°C에서 5분간 유지하고, 220°C까지 10°C/min으로 온도를 높인 후 3분간 머물렀다. 3°C/min로 290°C까지 온도를 올린 후 5분 간 머무름 시간을 주었다.
 - 이동상 기체로는 helium을 0.8mL/min로 이용하였고, splitless 모드로 설정하였다. 그리고 mass spectra ionization energy는 70 eV였고, mass scan range는 35-500 a.m.u였다.
- Free fatty acids의 정성은 mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행한 후, authentic standard (myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, behenic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid)로 확인하였고, 정량은 extract ion mode로 시행하였다(for myristic acid, m/z=313 for palmitic acid, m/z=341 for stearic acid, m/z=369 for arachidic acid, m/z=397 for behenic acid, m/z=339 for oleic acid, m/z=337 for linoleic acid, m/z=335 for linolenic acid, and m/z=327 for heptadecanoic acid (internal standard)).

④ Conjugated dienoic analysis (CDA) 분석

- CDA 값을 이용하면 지방 산화 정도를 확인할 수 있다. 측정 방법은 AOCS Official Method Ti-la-64 방법을 참고하여 본 시료에 맞게 수정하여 적용하였다. 100 mg 시료를 25 mL isooctane에 녹인 후, isooctane으로 5배 희석하였다. 희석한 시료는 spectrophotometer를 이용하여 233 nm에서 quartz cell로 흡광도를 측정하였고, 측정한 값을 아래 식에 대입하여 CDA 값을 구하였다.

$$\text{CDA (\%)} = \frac{0.84 \times A_{233}}{bc - K_0}$$

K_0 = Absorptivity by acid or ester groups (0.03)

A_{233} = Observed absorbance at 233 nm

b = Cell length (cm)

c = Concentration of sample in gL^{-1} of the final dilution used for the absorption measurement

⑤ 휘발성 대사체 실험 결과

- 전처리별 휘발성 대사체를 분석한 실험 결과는 표 7과 같다.

◦ 각 시료마다 물리적인 특성이 상이하여 내부표준물질 없이 각 화합물이 차지하는 상대적인 비율을 나타내었다.

표 7. 전처리별 휘발성 대사체

No.	RI	Volatile Compounds	Relative Peak Area (%) ^{a)}				
			GRD	FRG	FRNC	GRNC	BLC
Acids							
1	1445	Acetic acid	6.588±0.586 b	6.899±0.488 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a
Alcohols							
2	923	Propan-2-ol	0.289±0.046 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a	N.D. a
3	926	Ethanol	15.518±1.046 b	16.916±1.04 c	0.626±0.099 a	0.199±0.045 a	N.D. a
4	1022	Butan-2-ol	0.497±0.014 b	0.556±0.071 c	N.D. a	N.D. a	N.D. a
5	1098	2-Methylpropan-1-ol	1.594±0.145 c	1.689±0.135 c	0.08±0.016 a	N.D. a	1.139±0.278 b
6	1127	Pentan-2-ol	0.745±0.055 b	0.825±0.081 c	N.D. a	N.D. a	N.D. a
7	1150	Butan-1-ol	0.384±0.029 c	0.342±0.023 c	N.D. a	N.D. a	0.23±0.067 b
8	1164	Pent-1-en-3-ol	N.D. a	N.D. a	1.054±0.041 c	0.819±0.126 b	N.D. a
9	1209	3-Methylbutan-1-ol	17.892±1.818 c	18.185±1.845 c	N.D. a	N.D. a	13.985±3.167 b
10	1253	Pentan-1-ol	1.897±0.692 a	1.392±0.236 a	2.775±0.209 b	1.469±0.066 a	2.066±0.585va,b
11	1355	Hexan-1-ol	16.128±2.67 b	13.682±1.772 b	2.628±0.605 a	2.906±0.499 a	14.828±2.619 b
12	1396	Octan-3-ol	0.202±0.026 b	0.255±0.014 c	N.D. a	N.D. a	N.D. a
13	1400	2-Butoxyethanol	2.464±0.072 d	1.098±0.045 c	N.D. a	0.2±0.051 a,b	0.335±0.27 b
14	1448	Oct-1-en-3-ol	6.389±0.511 a	7.314±0.361 a	15.605±4.257 b	22.551±1.899 c	14.672±3.547 b
15	1492	2-Ethylhexan-1-ol	N.D. a	N.D. a	0.047±0.051 b	N.D. a	N.D. a
16	1619	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	N.D. a	0.202±0.051 b	N.D. a	0.222±0.086 b	0.232±0.015 b
17	>1619	2-Phenylethanol	N.D. a	0.071±0.005 c	0.016±0.002 b	0.014±0.004 b	N.D. a
Aldehydes							
18	904	3-Methylbutanal	N.D. a	N.D. a	0.053±0.013 c	0.033±0.001 b	N.D. a
19	965	Pentanal	N.D. a	N.D. a	2.544±0.129 c	2.042±0.088 b	N.D. a
20	1074	Hexanal	3.061±1.289 a	1.58±0.409 a	59.65±6.036 b	53.914±2.344 b	5.121±1.149 a

21	1122	(E)-Pent-2-enal	N.D. a	N.D. a	0.607±0.019 b	0.74±0.145 c	N.D. a
22	1179	Heptanal	0.095±0.051 a	N.D. a	2.154±0.341 c	1.037±0.057 b	0.927±0.663 b
23	1208	(E)-Hex-2-enal	N.D. a	N.D. a	N.D. a	1.206±0.074 b	N.D. a
24	1236	(E)-Hept-4-enal	N.D. a	N.D. a	0.157±0.038 c	0.059±0.001 b	N.D. a
25	1282	Octanal	N.D. a	N.D. a	0.063±0.019 b	0.197±0.026 c	N.D. a
26	1314	(E)-Hept-2-enal	N.D. a	N.D. a	1.863±0.15 b	2.477±0.211 c	N.D. a
27	1389	Nonanal	N.D. a	N.D. a	0.157±0.049 b	0.515±0.073 c	N.D. a
28	1393	(2E,4E)-Hexa-2,4-dienal	N.D. a	N.D. a	N.D. a	0.009±0 b	N.D. a
29	1419	(E)-Oct-2-enal	N.D. a	N.D. a	0.672±0.119 b	1.176±0.13 c	N.D. a
30	1453	(2E,4E)-Hepta-2,4-dienal	N.D. a	N.D. a	0.129±0.012 b	0.159±0.012 c	N.D. a
31	1513	Benzaldehyde	N.D. a	N.D. a	0.043±0.02 a,b	N.D. a	0.134±0.112 b
Benzene derivatives							
32	1026	Toluene	4.674±0.581 b	5.222±0.26 b	0.552±0.389 a	0.324±0.097 a	6.393±2.131 b
33	1118	Ethylbenzene	0.134±0.028 c	0.082±0.015 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a
34	1131	p-Xylene	0.13±0.021 b	0.09±0.008 b	N.D. a	N.D. a	0.119±0.07 b
Esters							
35	>1619	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	N.D. a	N.D. a	0.094±0.046 a	N.D. a	3.339±2.098 b
Furan derivatives							
36	937	2-Ethylfuran	1.191±0.261 b	1.43±0.096 b	0.138±0.018 a	0.242±0.029 a	2.219±0.504 c
37	1227	2-Pentylfuran	0.368±0.27 a	0.217±0.095 a	0.228±0.052 a	0.394±0.087 a	0.343±0.048 a
Ketones							
38	883	Butan-2-one	0.126±0.008 b	0.123±0.01 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a
39	963	2-Pentanone	2.671±0.326 b	2.381±0.251 b	N.D. a	N.D. a	2.632±0.425 b
40	1011	Pent-1-en-3-one	N.D. a	N.D. a	0.972±0.243 b	0.877±0.114 b	N.D. a
41	1051	Pentane-2,3-dione	N.D. a	N.D. a	0.403±0.092 b	0.331±0.03 b	N.D. a
42	1177	5-Methylhexan-2-one	N.D. a	N.D. a	N.D. a	N.D. a	0.168±0.008 b
43	1177	Heptan-2-one	0.21±0.035 b	0.2±0.029 b	0.018±0.004 a	0.129±0.176 a,b	N.D. a

44	1249	Octan-3-one	0.488±0.07 a,b	0.619±0.106 b,c	0.386±0.1 a	0.508±0.054 a,b,c	0.678±0.112 c
45	1294	Oct-1-en-3-one	N.D. a	N.D. a	1.342±0.29 b	2.004±0.07 c	N.D. a
46	1401	(E)-Oct-3-en-2-one	N.D. a	N.D. a	0.178±0.124 b	N.D. a	N.D. a
47	1577	3-Methyloxolan-2-one	0.268±0.017 b	0.259±0.035 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a
48	1612	Oxolan-2-one	1.533±0.085 d	1.371±0.102 c	0.063±0.026 a	N.D. a	0.404±0.093 b
S-containing compounds							
49	>1619	1,3-Benzothiazole	0.706±0.528 b	0.127±0.028 a	N.D. a	N.D. a	N.D. a
Hydrocarbons							
50	<883	Octane	0.514±0.068 b	0.536±0.102 b	0.025±0.007 a	0.02±0.003 a	0.687±0.174 b
51	996	Decane	0.351±0.046 b	0.378±0.066 b	N.D. a	N.D. a	0.409±0.232 b
Terpenes							
Terpenes							
52	1188	dl-Limonene	0.111±0.007 c	N.D. a	0.023±0.008 b	N.D. a	N.D. a
Pyrazines							
53	1258	2-Methylpyrazine	N.D. a	0.071±0.006 b	N.D. a	N.D. a	N.D. a

a) 전체 피크에서 각 화합물이 차지하는 비율 ± 표준편차

- 대두의 전처리별 휘발성 대사체를 분석한 결과 Acid류는 1종, Alcohol류는 16종, Aldehyde류는 14종, Benzene류는 3종, Ester류는 1종, Furan류는 2종, Ketone류는 11종, 황을 함유한 화합물은 1종, Hydrocarbon류는 2종, Terpene류는 1종, Pyrazine류는 1종으로 총 53개의 성분이 동정되었다.
- o 전처리별 시료는 동정된 모든 휘발성 대사체에서 유의적인 차이를 나타내고 있다.
- o Ethanol의 경우 GRD와 FRG에서, 3-methylbutan-1-ol은 GRD, FRG, BLC에서, oct-1-en-3-ol은 FRNC, GRNC, BLC에서, hexanal은 FRNC, GRNC에서 가장 많이 검출되었다.
- o 특히 hexanal은 NaCl 용액을 첨가한 시료의 경우에서 비교적 많이 검출되었는데, 이는 NaCl의 enzyme inactivation 보다 salting out의 효과가 더 크게 작용하였음을 유추할 수 있다.

⑥ Free fatty acids 실험 결과

- Free fatty acids의 실험 결과는 다음 표 8, 그림 18과 같다.

표 8. 전처리별 free fatty acids

	Relative peak area ^{a)}				
	GRD	FRG	GRNC	FRNC	BLC
Myristic acid	0.046±0.005 ^b	0.035±0.003 ^b	0.045±0.01 ^b	0.023±0.002 ^a	0.036±0.007 ^b
Palmitic acid	2.276±0.559 ^{a,b}	1.735±0.039 ^a	2.586±0.353 ^b	1.865±0.015 ^a	2.221±0.425 ^{a,b}
Stearic acid	1.539±0.219 ^{a,b}	1.243±0.032 ^a	2.307±0.378 ^c	1.741±0.043 ^b	1.478±0.334 ^{a,b}
Arachidic acid	0.01±0.003 ^{a,b}	0.01±0 ^{a,b}	0.017±0.005 ^c	0.013±0.001 ^{b,c}	0.006±0.002 ^a
Oleic acid	0.018±0.007 ^{b,c}	0.02±0.007 ^c	0.003±0.001 ^a	0.009±0.002 ^{a,b}	0.016±0.006 ^{b,c}
Linoleic acid	0.028±0.006 ^{b,c}	0.042±0.019 ^c	0.003±0.004 ^a	0.009±0.004 ^{a,b}	0.032±0.013 ^c
Linolenic acid	0.001±0 ^{a,b,c}	0.002±0.001 ^c	0.0002±0 ^a	0.0003±0 ^{a,b}	0.001±0.001 ^{b,c}
불포화/포화^{b)}	1.202	2.103	0.144	0.494	1.301

a) Extract ion mode를 이용하여 정량. 내부표준물질과의 비율 ± 표준편차

b) 포화지방산과 불포화지방산의 비율

- o 모든 전처리별 시료에서 palmitic acid와 stearic acid가 가장 많이 검출되었고, 불포화지방산의 비율은 FRG 시료에서 가장 크다.

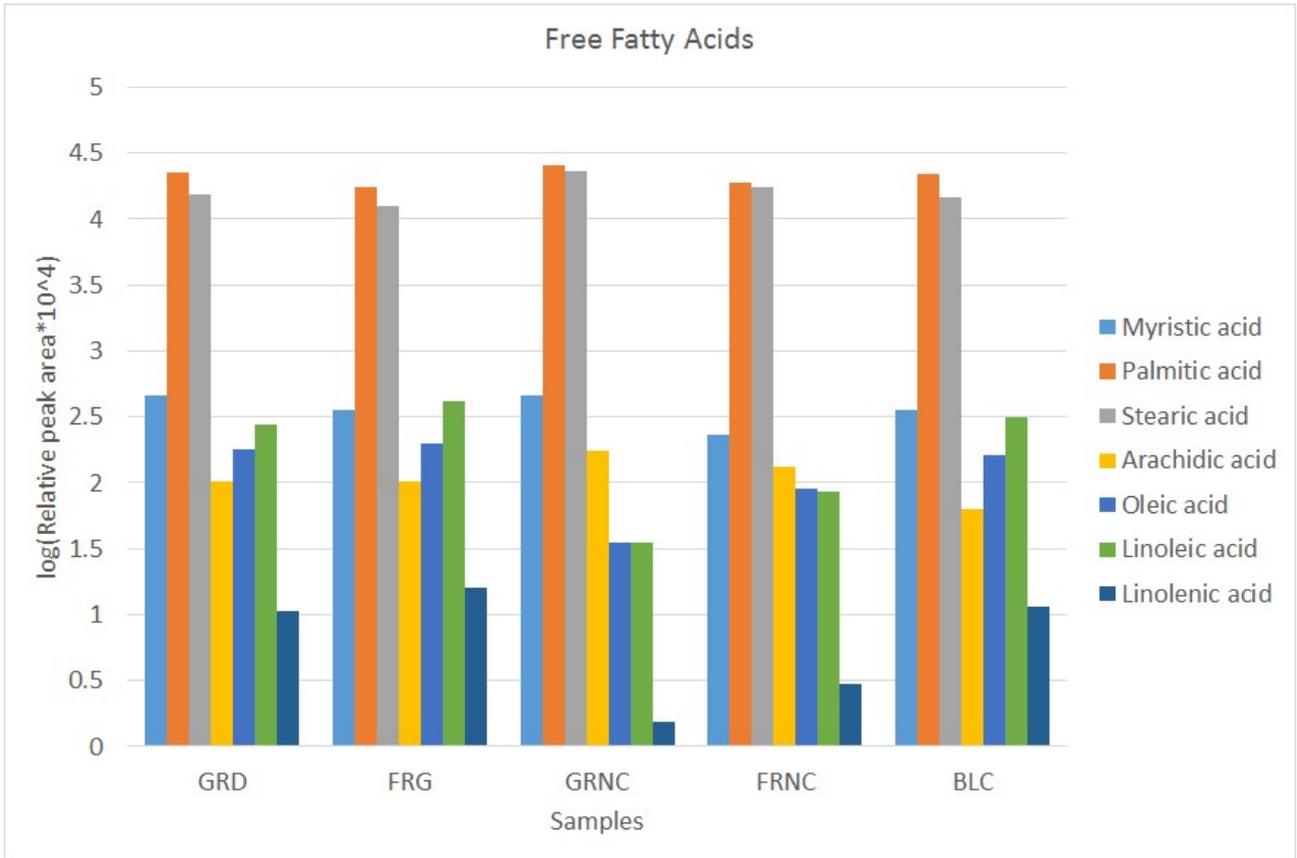


그림 18. 전처리별 free fatty acids

⑦ CDA 실험 결과

- 전처리별 대두의 CDA 값을 측정한 결과는 그림 19와 같다.

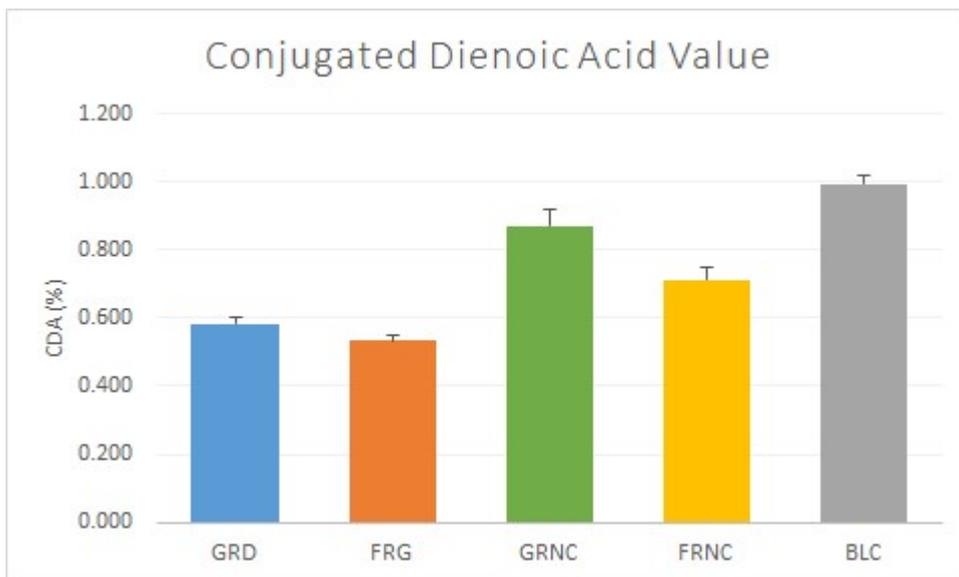


그림 19. CDA 값

- CDA는 공액형태 (conjugated type)로 결합된 산을 말한다. 일반적으로 자연계에서 지방산의 2개 이상의 이중결합 (1,4-penta-di-en)은 비공액형을 이루고 있는데, 3번 위치에 있는 수소가 해리되어 1번 또는 4번에 위치해있는 이중결합이 2번 또는 3번에 위치하게 되고, 이를 공액형이라고 한다. 이 conjugation 이중결합은 233 nm에서 높은 흡광도를 나타낸다(Lee, 2010).
- CDA는 FRG가 가장 낮고, BLC가 가장 높은 값을 나타내었다. BLC의 경우 데치는 과정에서 열에 의해 지방 산화가 촉진되었을 것으로 사료된다.

(나) 대두의 휘발성 대사체 추출 및 분석

① 시료 준비

- 대두의 휘발성 대사체 분석을 위해 농산물품질관리원으로부터 국내산 17종, 중국 현지에서 중국산 13종, 그리고 북미산 (미국, 캐나다) 6종을 얻어 실험을 진행하였다. 모든 시료는 2016년에 재배한 대두이다.
- 휘발성 대사체 분석을 위한 시료 종류는 표 9과 같다.

② 대두 휘발성 대사체의 Solid Phase Micro-Extraction (SPME)를 이용한 추출 방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME 방법

- 20 mL screw vial에 내부표준물질 L-borneol [1 mg/mL in *tert*-butanol and distilled water (1:200, v/v)] 5 μ L 와 원산지별 대두 시료를 알 콩 그대로 5 g 넣었다. 충분한 평형을 위해 분석 전 4°C에서 하루 동안 보관 후 분석에 사용하였다.
- 20 mL screw vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20mL screw vial을 250RPM, 40°C에서 30분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 20분간 흡착하였다. 그리고 20 0°C에서 5분간 유지하며 휘발성 성분을 탈착시켰다. 탈착과 동시에 크로마토그램의 분해능 향상을 위해 -80°C에서 5분 동안 cryo-trapping을 실시하였다.

- GC/MS 분석 방법

- SPME법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기성분은 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-Wax (30m length \times 0.25mm I.D. \times 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific)를 사용하였다. Oven은 40°C에서 10분간 유지하고, 42°C까지 2°C/min으로 온도를 높인 후 3분간 머물렀다. 4°C/min로 100°C까지 온도를 올린 후 5분 간 머무름 시간을 주었고, 4°C/min으로 180°C까지 올렸다. 그 후, 10°C/min로 200°C까지 온도를 증가시켰다.
- 이동상 기체로는 helium을 0.8mL/min로 이용하였고, splitless 모드로 설정하였다. 그리고 mass spectra ionization energy는 70 eV였고, mass scan range는 35-350 a.m.u였다.

③ 대두 휘발성 대사체의 동정 및 정량 방법

- SPME법으로 추출한 휘발성 대사체의 동정은 mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다. Hexane에 희석한 saturated alkanes [1 mg/mL in hexane]을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI를 구한 후 문헌상의 RI 값과 비교하였다. 분석된 모든 휘발성 대사체는 내부표준물질인 L-borneol [1 mg/mL in *tert*-butanol and distilled water (1:200, v/v))] 5 μ L를 이용하여 정량하였다.

④ 다변량 통계 분석

- SIMCA P+ software (SIMCA-P version 11.0, Umetrics, Umea, Sweden)로 다변량 통계 분석을 실시하여 PLS-DA score plot을 이용하여 시료 간의 차이를 확인하였다.

⑤ 실험 결과

- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 휘발성 대사체 분석 결과는 각각 표 10, 표 11, 표 12과 같다.

표 9. 휘발성 대사체 분석에 사용한 대두 시료 (국내, 중국, 북미)

Nation	Province	Location	Labeling
대한민국	경기	안성	GGAS
		이천	GGIC
	강원	춘천	GWCC
		영월	GWYW
	충북	음성	CBES
	충남	천안	CNCA
		공주	CNGJ
	전북	김제	JBGJ
		임실	JBIS
	전남	나주	JNNJ
		영광	JNYG
	경북	청도	KBCD
		의성	KBES
		영천	KBYC
	경남	창녕	KNCN
		밀양	KNMY
거창		KNGC	
중국	[동북부] 내몽골	싱안맹	INUL
	[동북부] 흑룡강성	하얼빈	HEHA
	[동북부] 기림성	메이허코우쓰	JIME
	[동북부] 라오닝성	단둥시	LIDA
	[중부] 하북성	스자좡	HESH
	[중부] 산둥성	지닝시	SHJI
	[중부] 후베이성	황스시	HUHU
	[중부] 안후이성	화이베이시	ANHU
	[중부] 절강성	핑후시	ZHPI
	[남부] 복건성	룽옌시	FULO
	[남부] 강서성	주장시	JJI
	[남부] 광둥성	사오관시	GUSH
	[남부] 광시(광서) 장족 자치구	바마야오족자치현	GUBA
미국	일리노이		IL
	인디애나		IN
	미네소타		MN
	미시간		MI
캐나다	퀘벡		QB
	온타리오		ON

표 10. 국내산 대두 휘발성 대사체

No.	RI	Volatile Compounds	Relative Peak Area ¹⁾																
			CBES	CNCA	CNGJ	GGAS	GGIC	GWCC	GMWV	JBGJ	JBIS	JNNJ	JNYG	KBCD	KBES	KBYC	KNCN	KNGC	KNMY
Acids																			
1	1449	Acetic acid	1.214 ±0.10 ¹	1.03 ±0.057	0.284 ±0.057	1.1 ±0.211	1.491 ±0.08	1.167 ±0.16	0.898 ±0.212	0.711 ±0.057	0.384 ±0.136	1.241 ±0.708	0.404 ±0.039	0.202 ±0.039	N.D. ²⁾	0.376 ±0.126	1.181 ±0.065	0.377 ±0.151	0.098 ±0.013
Alcohols																			
2	924	Propan-2-ol	N.D.	N.D.	0.045 ±0.007	N.D.	N.D.	N.D.	0.165 ±0.233	N.D.	N.D.	0.045 ±0.043	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.067 ±0.022	N.D.
3	928	Ethanol	1.293 ±0.091	2.099 ±0.267	1.852 ±0.335	1.285 ±0.18	0.495 ±0.031	2.497 ±0.323	5.416 ±0.462	4.1 ±0.793	2.928 ±1.975	5.302 ±2.205	2.052 ±0.298	N.D.	0.351 ±0.049	1.673 ±0.718	N.D.	3.123 ±0.756	1.473 ±0.22
4	1024	Butan-2-ol	1.089 ±0.189	N.D.	1.439 ±0.146	N.D.	1.291 ±0.029	1.898 ±0.298	1.466 ±0.157	N.D.	N.D.	N.D.	1.248 ±0.079	N.D.	N.D.	0.107 ±0.185	N.D.	N.D.	N.D.
5	1101	2-Methylpropan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.224 ±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.063 ±0.011	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	1129	1-Methoxypropan-2-ol	1.464 ±0.093	1.579 ±0.03	0.769 ±0.103	0.75 ±0.085	1.655 ±0.09	1.23 3±0.097	0.293 ±0.046	0.551 ±0.025	1.292 ±0.45	1.449 ±0.33	1.083 ±0.07	1.309 ±0.428	0.222 ±0.037	0.975 ±0.257	0.443 ±0.119	0.709 ±0.091	3.063 ±0.34
7	1151	Butan-1-ol	0.81 ±0.096	0.279 ±0.038	0.368 ±0.038	0.193 ±0.04	0.745 ±0.074	0.649 ±0.313	1.009 ±0.109	0.188 ±0.009	N.D.	0.329 ±0.141	0.369 ±0.009	3.35 ±1.359	N.D.	0.108 ±0.188	0.499 ±0.136	0.165 ±0.052	0.493 ±0.118
8	1194	2,5-Dimethylhexan-2-ol	0.274 ±0.006	0.227 ±0.021	0.224 ±0.025	N.D.	N.D.	0.258 ±0.027	0.275 ±0.034	0.217 ±0.011	0.233 ±0.009	0.27 ±0.087	0.23 ±0.021	0.226 ±0.144	0.356 ±0.035	0.174 ±0.302	0.293 ±0.013	0.313 ±0.031	0.344 ±0.059
9	1211	3-Methylbutan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.241 ±0.019	0.537 ±0.05	N.D.	4.1 ±5.626	N.D.	N.D.	0.645 ±0.091	N.D.	1.05 ±0.059	N.D.	N.D.
10	1255	Pentan-1-ol	0.367 ±0.019	0.723 ±0.25	0.502 ±0.038	0.507 ±0.18	0.136 ±0.011	0.333 ±0.018	0.301 ±0.055	0.424 ±0.011	N.D.	1.979 ±1.892	0.332 ±0.03	0.383 ±0.137	0.274 ±0.021	0.476 ±0.287	0.493 ±0.162	0.409 ±0.086	0.728 ±0.184
11	1304	2-Methylpentan-1-ol	N.D.	0.152 ±0.027	N.D.	N.D.	N.D.	0.087 ±0.007	0.129 ±0.002	0.069 ±0.002	N.D.	0.194 ±0.105	N.D.	N.D.	N.D.	0.21 ±0.098	N.D.	N.D.	N.D.
12	1344	Hexan-1-ol	0.568 ±0.052	1.777 ±0.467	1.566 ±0.226	0.813 ±0.491	0.071 ±0.007	0.209 ±0.021	1.001 ±0.286	1.54±0.1	0.604 ±0.228	6.45 ±7.518	0.585 ±0.07	0.465 ±0.092	1.252 ±0.08	0.611 ±0.65	1.938 ±0.632	0.641 ±0.178	2.145 ±0.046
13	1402	2-Butoxyethanol	N.D.	N.D.	0.059 ±0.012	N.D.	0.054 ±0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.079 ±0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.089 ±0.043	0.1 ±0.035
14	1449	Oct-1-en-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.674 ±0.035	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	1493	2-Ethylhexan-1-ol	8.806 ±0.692	10.443 ±0.929	13.104 ±0.546	9.74 ±1.446	5.697 ±0.23	6.864 ±0.262	10.167 ±0.402	8.925 ±0.309	8.434 ±2.989	11.863 ±1.932	5.995 ±0.502	7.06 ±1.883	2.517 ±0.445	4.624 ±1.299	3.85 ±3.381	14.73 ±0.7	8.315 ±0.577
16	1565	Octan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	0.114 ±0.027	0.043 ±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.098 ±0.041	N.D.	0.095 ±0.015	0.102 ±0.017	N.D.	0.254 ±0.021
17	1582	(2R,3S)-Butane-2,3-diol	0.198 ±0.021	0.092 ±0.024	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.366 ±0.56	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	1621	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	0.158 ±0.013	N.D.	0.024 ±0.014	N.D.	0.028 ±0.011	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.16 ±0.027	0.009 ±0.016	0.122 ±0.01	0.045 ±0.028	0.252 ±0.049	N.D.	N.D.
19	1643	5-Methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	N.D.	0.104 ±0.011	N.D.	0.068 ±0.06	0.061 ±0.002	N.D.	N.D.	0.064 ±0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.32 ±0.044	N.D.	N.D.
20	1661	1,1-Dimethylsilanediol	N.D.	N.D.	0.272 ±0.031	0.263 ±0.024	N.D.	N.D.	N.D.	0.299 ±0.045	0.248 ±0.075	N.D.	N.D.	0.235 ±0.064	0.291 ±0.068	0.225 ±0.077	N.D.	N.D.	0.349 ±0.039

21	1669	Nonan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.18 ±0.017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.055 ±0.048	N.D.	N.D.	0.141 ±0.032
22	1759	2-Phenylpropan-2-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.16 6±0.029	0.238 ±0.05	N.D.	N.D.	0.422 ±0.009
23	1832	1-Phenylethanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.218 ±0.012
24	1877	Phenylmethanol	0.161 ±0.021	0.122 ±0.008	N.D.	0.168 ±0.026	N.D.	0.1	±0.016	N.D.	N.D.	N.D.	0.3 ±0.073	0.148 ±0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.179 ±0.311
25	>1877	2-Phenylethanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.019 ±0.002	N.D.	0.004 ±0.006
26	>1877	2-(Phenoxy)ethanol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.014 ±0.005	N.D.	N.D.

Aldehydes

27	<810	Acetaldehyde	N.D.	0.11 ±0.018	0.029 ±0.002	N.D.	0.049 ±0.016	0.064 ±0.017	0.081 ±0.025	N.D.	0.106 ±0.01	N.D.	0.071 ±0.019	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.073 ±0.01	N.D.
28	861	2-Methylprop-2-enal	0.015 ±0.001	0.017 ±0.002	0.018 ±0.001	0.018 ±0.004	0.011 ±0.001	0.013 ±0.003	0.02 ±0.007	0.017 ±0.001	0.018 ±0.005	0.035 ±0.01	0.012 ±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.025 ±0.005	N.D.
29	968	Pentanal	N.D.	0.13 ±0.11	N.D.	N.D.														
30	1074	Hexanal	0.604 ±0.097	4.607 ±4.338	1.973 ±0.857	3.815 ±4.195	0.324 ±0.034	0.834 ±0.042	0.555 ±0.167	1.052 ±0.076	4.518 ±1.02	2.108 ±2.591	0.445 ±0.388	3.055 ±0.857	1.253 ±0.372	3.224 ±3.711	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
31	1181	Heptanal	N.D.	0.264 ±0.077	0.198 ±0.021	0.3±0.08	0.102 ±0.01	0.149 ±0.026	N.D.	0.171 ±0.011	N.D.	N.D.	0.105 ±0.008	0.005 ±0.008	0.133 ±0.028	0.42 ±0.29	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
32	1210	(E)-Hex-2-enal	N.D.	N.D.	N.D.	0.255 ±0.033	N.D.	0.103 ±0.09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.						
33	1285	Octanal	0.057 ±0.019	0.12 ±0.051	0.093 ±0.009	0.349 ±0.083	0.12 4±0.02	0.071 ±0.005	0.068 ±0.029	0.187 ±0.025	0.107 ±0.02	0.123 ±0.013	0.094 ±0.003	0.174 ±0.034	0.156 ±0.027	0.407 ±0.363	0.16 ±0.009	0.234 ±0.017	0.247 ±0.099	N.D.
34	1391	Nonanal	±0.159	±0.189	±0.012	±0.256	±0.101	±0.059	±0.196	±0.063	±0.165	±0.172	±0.107	±0.267	±0.192	±1.754	±0.079	±0.1	±0.762	N.D.
35	1515	Benzaldehyde	0.191 ±0.008	0.198 ±0.027	0.197 ±0.044	0.217 ±0.021	0.119 ±0.012	0.152 ±0.004	N.D.	N.D.	0.178 ±0.023	0.241 ±0.074	0.204 ±0.016	0.382 ±0.088	0.094 ±0.007	0.595 ±0.237	0.114 ±0.005	0.122 ±0.021	0.693 ±0.062	N.D.

Benzene derivatives

36	1119	Ethylbenzene	N.D.	0.094 ±0.063	0.148 ±0.132	N.D.	N.D.	0.055 ±0.005	0.48 ±0.053	0.061 ±0.01	0.031 ±0.053	0.475 ±0.217	0.064 ±0.009	0.164 ±0.064	0.205 ±0.294	0.925 ±0.581	0.152 ±0.042	N.D.	1.326 ±0.302
37	1126	1,4-Dimethylbenzene	N.D.	N.D.	0.022 ±0.038	N.D.	N.D.	N.D.	0.345 ±0.038	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.013 ±0.023	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
38	1133	1,3-Dimethylbenzene	N.D.	N.D.	0.078 ±0.135	N.D.	N.D.	N.D.	1.24 5±0.112	N.D.	N.D.	N.D.	0.009 ±0.008	0.146 ±0.094	0.182 ±0.083	0.129 ±0.069	0.138 ±0.068	0.582 ±0.215	0.128± 0.026
39	1175	1,2-Dimethylbenzene	N.D.	N.D.	0.042 ±0.072	N.D.	N.D.	N.D.	1.613 ±0.159	N.D.	N.D.	N.D.	0.043 ±0.002	N.D.	0.109 ±0.056	0.048 ±0.023	N.D.	1.027 ±0.28	0.086 ±0.035
40	1250	Ethylbenzene	0.355 ±0.033	0.725 ±0.209	0.532 ±0.148	0.66 ±0.111	0.165 ±0.034	0.392 ±0.04	0.963 ±0.116	0.317 ±0.027	0.424 ±0.256	2.647 ±0.89	0.461 ±0.041	0.55 ±0.232	0.801 ±0.141	1.618 ±0.956	0.382 ±0.328	0.708 ±0.114	1.588 ±0.371
41	1264	1-Methyl-3-propan-2-ylbenzene	0.036 ±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.25 ±0.248	N.D.						

Esters

42	810	Methyl acetate	0.257 ±0.023	0.187 ±0.005	0.151 ±0.066	0.208 ±0.017	N.D.	0.316 ±0.067	0.481 ±0.038	0.331 ±0.024	0.124 ±0.087	0.351 ±0.185	0.24 1±0.027	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.133 ±0.047	N.D.
43	872	Ethyl acetate	0.068 ±0.017	0.255 ±0.037	0.373 ±0.396	0.09 ±0.038	0.076 ±0.006	0.645 ±0.12	0.149 ±0.027	0.117 ±0.01	0.475 ±0.461	0.227 ±0.147	0.401 ±0.158	0.048 ±0.022	0.03 ±0.006	0.047 ±0.017	0.1 ±0.088	0.116 ±0.046	0.041 ±0.006
44	1174	Butyl prop-2-enoate	N.D.	0.074 ±0.02	N.D.	0.133 ±0.053	N.D.	1.052 ±1.003	N.D.	N.D.	0.951 ±0.394	N.D.	N.D.						
45	1220	Butyl butanoate	N.D.	0.232 ±0.113	N.D.	N.D.	0.196 ±0.182	N.D.	N.D.										
Furan derivatives																			
46	<810	Furan	N.D.	0.014 ±0.002	N.D.	N.D.	0.006 ±0.001	0.003 ±0.003	N.D.	N.D.	N.D.								
47	850	2-Methylfuran	0.038 ±0.005	0.049 ±0.011	0.036 ±0.01	0.06 5±0.011	0.034 ±0.001	0.03 ±0.009	0.09 ±0.009	0.04 5±0.001	0.042 ±0.011	0.106 ±0.029	0.024 ±0.007	0.02 ±0.008	0.015 ±0.003	0.017 ±0.004	0.021 ±0.02	0.061 ±0.017	0.037 ±0.008
48	861	2,5-Dihydrofuran	N.D.	0.005 ±0.001	0.009 ±0.004	0.058 ±0.1	N.D.	N.D.											
49	826	3-Methylfuran	N.D.	N.D.	0.004 ±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	0.033 ±0.003	0.007±0	0.004 ±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.133 ±0.23	0.042 ±0.009	N.D.
50	940	2-Ethylfuran	0.137 ±0.019	0.242 ±0.095	0.117 ±0.003	0.297 ±0.092	0.037 ±0.005	0.069 ±0.002	0.319 ±0.047	0.178±	0.167	0.515	0.063	0.074	0.069	0.126	0.1	0.353	0.182
51	1230	2-Pentylfuran	0.044 ±0.004	0.129 ±0.146	0.035 ±0.015	0.169 ±0.167	N.D.	N.D.	N.D.	0.045 ±0.009	0.083 ±0.014	0.072 ±0.028	N.D.	±0.028	±0.039	0.44	±0.038	±0.009	±0.145
Ketones																			
52	<810	Propan-2-one	2.116 ±0.224	3.387 ±0.565	3.193 ±0.12	2.845 ±0.275	2.991 ±0.548	2.127 ±0.256	8.92 ±0.924	6.879±0.	5.325	9.086 ±4.373	2.599 ±0.214	1.207 ±0.318	0.892 ±0.07	1.081 ±0.459	1.729 ±0.419	5.909 ±0.938	3.266 ±0.965
53	889	Butan-2-one	0.308 ±0.04	0.608 ±0.041	0.534 ±0.078	0.571 ±0.058	0.13 ±0.03	0.269 ±0.022	1.268±	0.539±0.	0.514	1.019 ±0.321	0.405 ±0.092	0.133 ±0.029	0.289 ±0.029	0.314 ±0.163	16.19 ±27.353	1.02±	0.453 ±0.063
54	966	2-Pentanone	N.D.	N.D.	0.042 ±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	0.312 ±0.038	0.133±0.	N.D.	0.602 ±0.317	0.026 ±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.227 ±0.061	N.D.
55	1120	(E)-Pent-3-en-2-one	N.D.	0.073 ±0.03	0.023 ±0.009	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.012±0.	0.4	0.102 ±0.029	0.02 ±0.005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
56	1178	Heptan-2-one	N.D.	0.026 ±0.023	N.D.	0.038 ±0.033	N.D.	N.D.	N.D.										
57	1279	3-Hydroxybutan-2-one	0.029 ±0.006	N.D.	N.D.	N.D.													
58	1297	Oct-1-en-3-one	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.051 ±0.012	N.D.	N.D.	N.D.							
59	1336	6-Methylhept-5-en-2-one	N.D.	N.D.	0.05 ±0.009	N.D.	N.D.	0.034 ±0.008	0.042 ±0.014	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.102 ±0.031	0.043 ±0.011	0.044 ±0.012	0.045 ±0.014	N.D.	0.442 ±0.045
60	1490	2-Decanone	N.D.	0.153 ±0.061	N.D.														
61	1600	5-Methylxolan-2-one	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.071 ±0.014	N.D.	N.D.	N.D.							
62	1613	Oxolan-2-one	0.22 ±0.012	0.387 ±0.073	0.437 ±0.603	0.146 ±0.02	0.114 ±0.003	0.145 ±0.015	0.215 ±0.171	0.161 ±0.008	0.09 ±0.04	0.589 ±0.396	0.177 ±0.018	0.124 ±0.027	0.429 ±0.13	0.272 ±0.047	0.317 ±0.063	0.196 ±0.027	0.13 ±0.095
63	1641	1-Phenylethanone	N.D.	±0.078	±0.039	±0.196	N.D.	N.D.	±0.102										
64	1688	5-Ethylxolan-2-one	N.D.	0.071	0.065	0.098	N.D.	N.D.	0.056	0.075	N.D.	0.137	0.074	0.04	0.041	0.074	0.079	N.D.	0.189

			±0.011	±0.002	±0.024				±0.004	±0.006		±0.049	±0.004	6±0.007	±0.004	±0.022	±0.02		±0.017
N-containing compounds																			
65	<810	N,N-Dimethylmethanamine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.024 ±0.005	N.D.	0.038 ±0.029	0.028 ±0.01	N.D.	0.157 ±0.012							
66	1178	Pyridine	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 ±0.005	N.D.	N.D.	0.055 ±0.051	N.D.	N.D.	N.D.							
67	1324	N,N-Dimethylformamide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.032 ±0.002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.05 ±0.009	N.D.	N.D.	N.D.
68	1782	Methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	0.058 ±0.011	N.D.	N.D.	0.054 ±0.027	0.048 ±0.015	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.095 ±0.029	0.071 ±0.017	0.073 ±0.052	N.D.	N.D.	N.D.
S-containing compounds																			
69	<810	Methylsulfanyl methane	0.114 ±0.073	0.121 ±0.01	0.083 ±0.015	0.076 ±0.039	0.006 ±0.002	0.029 ±0.003	0.621 ±0.123	0.423 ±0.08	0.053 ±0.045	0.566 ±0.078	0.039 ±0.003	0.033 ±0.023	0.198 ±0.223	0.127 ±0.041	0.221 ±0.048	0.64 ±0.197	0.307 ±0.069
70	>1877	1,3-Benzothiazole	0.169 ±0.065	0.203 ±0.102	0.14 ±0.048	0.163 ±0.05	0.167 ±0.011	0.156 ±0.014	0.157 ±0.043	0.157 ±0.006	0.136 ±0.062	0.232 ±0.073	0.114 ±0.027	0.415 ±0.079	0.256 ±0.09	0.683 ±0.239	0.388 ±0.106	0.159 ±0.042	0.409 ±0.219
Hydrocarbons																			
71	<810	2-Methylprop-1-ene	0.022 ±0.002	0.035± 0.007	0.025 ±0.005	0.017 ±0.005	0.022 ±0.001	0.044 ±0.012	0.031 ±0.004	0.022 ±0.001	0.029 ±0.006	0.026 ±0.006	0.043 ±0.007	0.045 ±0.008	0.045 ±0.005	0.043 ±0.021	0.036 ±0.005	0.029 ±0.003	0.036 ±0.004
72	<810	Pentane	N.D.	0.026 ±0.019	0.025 ±0.004	N.D.	0.006 ±0.001	0.011 ±0.001	0.02 ±0.004	0.014±0 ±0.004	N.D.	0.225 ±0.36	0.011±0 ±0.187	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.015 ±0.001	0.011 ±0.006
73	<810	Hexane	0.048 ±0.005	0.111 ±0.011	0.137 ±0.066	0.059 ±0.008	0.039 ±0.004	0.078 ±0.025	0.101 ±0.039	0.088± 0.01	0.129 ±0.108	0.187 ±0.019	0.101 ±0.016	0.205 ±0.052	N.D.	N.D.	0.157 ±0.046	0.192 ±0.117	N.D.
74	<810	Heptane	N.D.	0.031 ±0.007	0.044 ±0.024	0.033 ±0.002	0.022 ±0.003	0.028 ±0.004	0.044 ±0.008	0.027± 0.003	0.03 ±0.006	0.05 ±0.005	0.023 ±0.001	0.022 ±0.007	0.023 ±0.002	0.036 ±0.018	0.022 ±0.005	0.04 ±0.003	0.035 ±0.005
75	<810	Methylcyclohexane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.002 ±0.004	0.013 ±0.005	0.017 ±0.001	N.D.	N.D.	0.015 ±0.004							
76	<810	Octane	0.025 ±0.004	0.03 ±0.005	0.043 ±0.046	0.045 ±0.007	N.D.	0.013 ±0.002	0.037 ±0.003	0.024 ±0.003	0.023 ±0.011	0.083 ±0.029	0.012 ±0.001	0.028 ±0.011	0.021 ±0.003	0.043± 0.033	0.031 ±0.01	0.068 ±0.028	0.05 6±0.006
77	1198	Dodecane	0.05 ±0.087	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.256 ±0.135	0.108 ±0.027	0.24 ±0.041	0.17 ±0.082	N.D.	0.161 ±0.015						
78	1277	Pentylcyclopentane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.022 ±0.037	N.D.	N.D.	0.178 ±0.118	N.D.	N.D.							
79	1399	Tetradecane	N.D.	0.042 ±0.058	N.D.	N.D.	0.111 ±0.073	0.072 ±0.012	0.094 ±0.038	0.057 ±0.002	N.D.	0.107 ±0.008							
Terpenes																			
80	1092	β-Pinene	N.D.	N.D.	0.097 ±0.014	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
81	1157	l-Phellandrene	0.087 ±0.039	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.						
82	1190	dl-Limonene	0.039 ±0.011	N.D.	0.028 ±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.196 ±0.132	N.D.	0.43 ±0.519	N.D.	0.134 ±0.231	0.127 ±0.083	N.D.	0.065 ±0.022
83	1198	Sabinene	0.142 ±0.143	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.042 ±0.072	N.D.	0.022 ±0.038	N.D.	N.D.	N.D.						

84	1243	γ -Terpinene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.5 ± 0.723	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
85	1736	Azulene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.109 ± 0.019
Phenols																					
86	>1877	Phenol	N.D.	N.D.	N.D.	0.004 ± 0.006	0.037 ± 0.003	0.014 ± 0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.031 ± 0.01	0.02 ± 0.005	0.025 ± 0.025	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 4 ± 0.00 1

1) 각 화합물의 피크 면적을 내부표준물질의 면적으로 나누어 구한 값의 평균±표준편차

2) N.D. = Not Detected

표 11. 중국산 대두 휘발성 대사체

No.	RI	Volatile Compounds	Relative Peak Area ^D												
			INUL	HEHA	JIME	LIDA	HESH	SHJI	HUHU	ANHU	ZHPI	FULO	JLJI	GUSH	GUBA
Acids															
1	1448	Acetic acid	2.803±0.023	N.D.	N.D.	N.D.	0.033±0.014	0.021±0.013	N.D.	0.035±0.012	2.07±0.048	9.045±3.215	N.D.	7.543±1.88	2.55±0.266
2	1861	Hexanoic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.355±0.489	N.D.	N.D.	N.D.
Alcohols															
3	925	Propan-2-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	930	Ethanol	4.229±1.103	0.86±0.098	4.304±1.362	0.96±0.033	9.618±3.136	3.465±0.89	4.822±5.155	25.695±3.938	8.165±0.833	20.333±11.479	3.426±0.827	4.168±0.999	2.998±0.478
5	1024	Butan-2-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	1098	2-Methylpropan-1-ol	0.158±0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.27±0.101	0.598±0.56	N.D.	N.D.
7	1129	1-Methoxypropan-2-ol	0.349±0.034	0.321±0.027	0.357±0.135	0.147±0.018	0.611±0.114	0.371±0.036	0.646±0.379	0.772±0.017	1.612±0.165	4.209±0.863	2.695±0.637	2.996±0.366	4.071±0.463
8	1151	Butan-1-ol	1.867±0.267	3.356±0.095	4.218±2.108	2.114±0.268	7.326±2.199	5.08±0.928	16.827±12.654	13.653±0.435	19.744±1.306	22.487±6.99	14.498±3.18	13.835±3.352	10.915±1.36
9	1194	2,5-Dimethylhexan-2-ol	N.D.	N.D.	N.D.	0.334±0.029	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.51±0.14	N.D.	0.231±0.013	N.D.
10	1212	3-Methylbutan-1-ol	2.162±0.051	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.732±0.955	2.792±1.953	N.D.	N.D.	N.D.
11	1255	Pentan-1-ol	0.356±0.005	0.159±0.021	0.342±0.066	0.348±0.043	0.347±0.222	0.348±0.046	1.138±1.256	0.827±0.16	0.811±0.371	3.591±1.275	0.221±0.03	0.679±0.208	1.173±0.306
12	1289	Heptan-4-ol	0.031±0.011	0.048±0.005	0.062±0.02	0.023±0.002	0.138±0.087	0.103±0.026	0.233±0.156	0.247±0.027	0.148±0.022	0.245±0.121	0.217±0.052	0.072±0.032	0.105±0.012
13	1345	3-Methylheptan-4-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.147±0.026	N.D.	N.D.	0.086±0.071	N.D.	0.069±0.008
14	1358	Hexan-1-ol	1.492±0.028	0.969±0.186	1.52±0.492	3.028±0.329	1.89±1.579	1.532±0.345	8.174±10.29	4.77±0.994	2.757±0.901	9.973±3.294	1.009±0.116	0.903±0.018	1.834±0.33
15	1398	Octan-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.239±0.111	0.571±0.17	N.D.	N.D.
16	1402	2-Butoxyethanol	0.136±0.007	N.D.	N.D.	N.D.	0.533±0.232	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.041±0.004	N.D.	0.197±0.053	N.D.
17	1428	3-Methoxy-3-methylbutan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.234±0.032	1.235±0.45	7.942±1.853	0.432±0.088	0.303±0.049
18	1448	Oct-1-en-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.	0.123±0.035	N.D.	0.104±0.031	N.D.	0.184±0.106	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	1454	Heptan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.151±0.016	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	1493	2-Ethylhexan-1-ol	1.899±0.203	1.605±0.608	1.862±0.228	0.529±0.028	3.59±2.246	2.29±0.443	4.065±1.931	4.641±0.438	3.341±0.213	4.323±1.25	3.787±0.732	0.871±0.377	2.303±0.562
21	1565	Octan-1-ol	N.D.	N.D.	0.11±0.038	0.205±0.028	0.234±0.124	N.D.	0.339±0.313	N.D.	N.D.	0.559±0.163	0.121±0.026	N.D.	N.D.
22	1582	(2R,3S)-Butane-2,3-diol	0.074±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.387±0.306	N.D.	N.D.	0.399±0.184	N.D.	N.D.	N.D.
23	1594	Propane-1,2-diol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.612±0.267	N.D.	N.D.
24	1642	5-Methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	0.185±0.006	0.167±0.025	N.D.	0.106±0.012	0.246±0.078	N.D.	0.2±0.115	0.229±0.038	0.213±0.016	0.418±0.15	0.175±0.018	0.689±0.061	0.248±0.034
25	1661	1,1-Dimethylsilanediol	0.294±0.019	N.D.	N.D.	N.D.	0.447±0.182	0.312±0.066	0.561±0.4	0.185±0.023	0.529±0.053	1.042±0.395	N.D.	0.481±0.136	N.D.
26	1666	Nonan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	0.221±0.035	0.285±0.245	N.D.	0.336±0.443	N.D.	N.D.	0.411±0.161	N.D.	N.D.	N.D.
27	1759	2-Phenylpropan-2-ol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.041±0.019	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
28	1875	Phenylmethanol	0.27±0.009	N.D.	N.D.	N.D.	0.579±0.248	0.23±0.028	0.328±0.192	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.737±0.875	0.286±0.025
Aldehydes															
29	<810	Acetaldehyde	N.D.	N.D.	0.181±0.084	N.D.	0.189±0.061	0.09±0.023	0.229±0.191	0.495±0.043	0.161±0.059	N.D.	0.097±0.048	N.D.	0.054±0.016
30	857	Butanal	N.D.	0.016±0.002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.639±0.824	0.091±0.006	0.143±0.054	N.D.	0.114±0.037	N.D.	0.019±0.005
31	863	2-Methylprop-2-enal	N.D.	0.011±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.026±0
32	1074	Hexanal	0.406±0.012	1.889±0.312	2.878±0.389	2.468±0.076	2.456±0.34	2.43±0.636	5.467±2.274	6.196±1.01	0.767±0.121	10.439±3.156	1.429±0.245	1.721±0.489	5.322±2.829
33	1181	Heptanal	N.D.	0.337±0.048	0.3±0.032	0.291±0.019	0.739±0.127	0.353±0.047	0.65±0.306	0.598±0.074	N.D.	1.021±0.33	0.417±0.094	N.D.	0.331±0.025
34	1210	(E)-Hex-2-enal	N.D.	0.511±0.103	0.4±0.131	N.D.	0.409±0.186	0.37±0.049	1.27±0.901	0.895±0.202	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.515±0.125
35	1285	Octanal	0.15±0.015	0.472±0.07	0.349±0.065	0.426±0.045	0.861±0.088	0.372±0.1	0.614±0.19	0.485±0.07	0.093±0.002	1.032±0.154	0.662±0.134	0.223±0.063	0.397±0.06
36	1317	(E)-Hept-2-enal	N.D.	N.D.	0.069±0.033	N.D.	0.076±0.015	0.04±0.015	0.133±0.112	0.1±0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

37	1391	Nonanal	0.571±0.074	2.673±0.323	2.068±0.325	3.235±0.193	6.729±0.874	2.079±0.734	3.405±0.612	2.15±0.244	0.86±0.124	3.724±0.958	3.92±0.625	0.709±0.183	2.361±0.137
38	1420	(E)-Oct-2-enal	N.D.	N.D.	0.145±0.064	N.D.	0.164±0.065	N.D.	0.317±0.265	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
39	1495	Decanal	N.D.	N.D.	N.D.	0.212±0.019	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
40	1514	Benzaldehyde	0.527±0.054	0.369±0.022	0.487±0.038	0.208±0.003	0.842±0.152	0.402±0.061	0.651±0.125	0.486±0.032	0.369±0.304	0.685±0.185	0.517±0.072	17.114±14.95	1.229±0.248
41	1532	(E)-Non-2-enal	N.D.	0.167±0.017	N.D.	0.364±0.023	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Benzene derivatives															
42	1027	Methylbenzene	17.019±2.87	5.657±0.743	2.736±0.872	2.259±0.017	10.099±10.187	2.709±1.22	13.237±19.586	5.453±1.022	5.707±1.842	N.D.	3.99±2.072	7.867±3.989	1.45±0.03
43	1119	Ethylbenzene	0.221±0.047	0.162±0.016	0.156±0.048	0.059±0.005	N.D.	0.145±0.074	0.784±1.239	0.187±0.014	0.208±0.069	0.336±0.226	0.325±0.196	0.195±0.199	N.D.
44	1126	1,4-Dimethylbenzene	N.D.	0.091±0.011	0.064±0.025	0.03±0.015	0.129±0.186	0.07±0.045	0.265±0.432	0.072±0.011	0.053±0.018	N.D.	0.256±0.151	N.D.	N.D.
45	1133	1,3-Dimethylbenzene	0.358±0.079	0.202±0.022	0.249±0.099	0.14±0.011	0.569±0.591	0.231±0.138	0.702±1.032	0.17±0.022	0.232±0.078	0.812±0.523	0.564±0.335	0.37±0.317	0.077±0.003
46	1250	Ethylbenzene	N.D.	N.D.	0.106±0.017	N.D.	0.246±0.177	0.122±0.031	0.283±0.262	0.099±0.05	N.D.	0.758±0.334	0.571±0.296	0.219±0.143	0.077±0.02
47	1264	1-Methyl-3-propan-2-ylbenzene	0.016±0.004	N.D.	N.D.	N.D.	0.192±0.212	0.047±0.03	0.145±0.181	0.059±0.014	0.219±0.126	0.657±0.43	0.074±0.046	0.241±0.239	0.046±0.015
48	1273	1,2,3-Trimethylbenzene	0.033±0.009	0.034±0.011	0.039±0.017	0.02±0.008	0.186±0.177	0.055±0.028	0.145±0.18	0.058±0.01	0.046±0.015	0.272±0.219	0.109±0.057	0.109±0.129	N.D.
49	1820	1-Methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]benzene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.152±0.028	N.D.	N.D.
Esters															
50	810	Methyl acetate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.611±0.225	0.179±0.044	0.408±0.103	0.23±0.031
51	873	Ethyl acetate	0.481±0.044	N.D.	0.114±0.048	N.D.	0.28±0.221	N.D.	N.D.	0.421±0.076	0.401±0.111	1.775±1.085	0.496±0.22	0.796±0.386	0.273±0.092
52	947	Ethyl propanoate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.031±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
53	1067	Butyl acetate	4.851±1.253	0.373±0.035	2.314±0.372	0.438±0.103	6.813±6.189	1.439±0.818	6.744±8.587	2.022±0.543	0.475±0.047	5.451±3.763	5.333±2.749	4.264±1.76	2.507±0.34
54	1141	Butyl propanoate	1.965±0.636	0.931±0.035	2.016±0.229	0.545±0.103	4.842±4.519	1.73±0.902	6.1±7.201	3.112±0.451	0.36±0.141	4.284±2.817	3.599±1.821	1.438±1.303	1.306±0.155
55	1175	Butyl prop-2-enoate	1.139±0.325	1.022±0.08	1.127±0.189	0.467±0.054	2.585±2.434	1.182±0.461	3.213±3.434	1.832±0.225	0.516±0.078	3.469±2.101	1.91±0.887	1.35±1.185	0.661±0.05
56	1217	Butyl butanoate	3.191±1.332	3.425±0.271	4.822±0.995	1.452±0.208	10.555±8.953	5.871±3.489	13.69±12.42	12.291±1.29	1.681±0.327	15.808±9.685	8.919±4.203	3.205±3.7	3.145±0.311
57	1234	Ethyl hexanoate	N.D.	N.D.	0.059±0.053	N.D.	0.283±0.125	0.052±0.017	0.083±0.04	0.159±0.021	N.D.	0.359±0.15	N.D.	N.D.	0.082±0.018
58	1384	2-Ethylhexyl acetate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.124±0.099	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
59	1479	2-Ethylhexyl prop-2-enoate	0.111±0.119	0.195±0.062	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.405±0.162	1.095±0.309	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
60	1664	Triethyl phosphate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.992±1.25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
61	1765	Methyl 2-hydroxybenzoate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.486±0.068	N.D.	N.D.	N.D.	0.39±0.131	N.D.
62	1777	(Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	0.203±0.061	0.196±0.013	N.D.	N.D.	N.D.	0.116±0.121	0.259±0.185	N.D.	0.084±0.013	0.281±0.123	0.093±0.019	N.D.	0.085±0.014
63	1850	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	0.06±0.004	0.399±0.245	0.218±0.202	0.235±0.099	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.446±0.153	N.D.
Furan derivatives															
64	863	3-Methylfuran	N.D.	N.D.	N.D.	0.035±0.014	0.01±0.001	N.D.	N.D.	0.033±0.01	0.019±0.003	0.183±0.069	0.021±0.003	N.D.	0.013±0.002
65	873	2-Methylfuran	0.039±0.004	0.009±0.005	0.013±0.004	0.004±0.001	N.D.	0.018±0.002	0.05±0.064	0.02±0.007	0.02±0.004	0.055±0.021	0.018±0.008	N.D.	0.076±0.01
66	941	2-Ethylfuran	0.088±0.014	0.116±0.034	0.142±0.04	0.181±0.015	0.064±0.014	0.154±0.047	0.793±1.026	0.38±0.084	0.113±0.041	0.742±0.306	0.113±0.024	0.213±0.099	0.2±0.033
67	1230	2-Pentylfuran	0.057±0.004	0.104±0.019	0.314±0.14	0.074±0.015	0.369±0.139	0.334±0.015	0.745±0.534	0.357±0.103	N.D.	0.57±0.163	0.079±0.011	0.139±0.008	0.155±0.057
Ketones															
68	<810	Propan-2-one	3.145±0.203	N.D.	1.938±0.338	1.551±0.035	1.318±0.91	0.939±0.292	6.598±8.154	3.108±0.657	2.176±0.256	5.92±2.77	1.356±0.203	3.481±0.914	6.734±1.24
69	890	Butan-2-one	0.35±0.032	0.221±0.046	0.379±0.043	0.428±0.043	0.242±0.116	0.328±0.071	1.181±1.375	0.733±0.154	1.005±0.177	0.908±0.39	0.451±0.072	0.692±0.302	0.848±0.127

70	944	Bicyclo[4.1.0]heptan-5-one	N.D.												
71	966	2-Pentanone	0.081±0.011	N.D.	0.038±0.006	0.155±0.021	0.03±0.017	0.057±0.015	N.D.	N.D.	0.834±0.376	2.211±0.911	0.034±0.014	0.141±0.026	0.84±0.133
72	1097	1-Methoxypropan-2-one	N.D.	0.28±0.046											
73	1121	(E)-Pent-3-en-2-one	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.221±0.294	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.591±0.524	N.D.	N.D.	2.298±0.303
74	1122	Heptan-4-one	N.D.	0.167±0.028	0.148±0.003	N.D.	N.D.	0.194±0.048	0.473±0.387	0.419±0.046	0.33±0.004	N.D.	0.291±0.081	N.D.	N.D.
75	1145	3-Methylheptan-4-one	0.187±0.077	0.499±0.032	0.411±0.052	0.177±0.02	0.909±0.85	0.596±0.239	1.855±2.112	1.119±0.115	0.789±0.234	2.281±1.624	0.962±0.515	1.074±1.047	0.254±0.024
76	1171	2,6-Dimethylheptan-4-one	N.D.	1.98±3.064	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.						
77	1178	Heptan-2-one	N.D.	N.D.	0.049±0.005	0.065±0.004	0.025±0.019	0.063±0.008	0.17±0.155	0.107±0.02	0.091±0.019	0.348±0.136	N.D.	0.06±0.007	0.118±0.065
78	1252	Octan-3-one	N.D.	0.246±0.108	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.							
79	1279	3-Hydroxybutan-2-one	N.D.	0.074±0.027	0.182±0.073	N.D.	N.D.	0.122±0.034							
80	1282	Octan-2-one	N.D.	N.D.	N.D.	0.088±0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.068±0.026	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
81	1335	6-Methylhept-5-en-2-one	0.099±0.019	0.097±0.014	0.153±0.098	0.086±0.01	0.271±0.04	0.092±0.013	N.D.	0.106±0.017	0.086±0.006	N.D.	0.085±0.01	0.063±0.03	0.1±0.032
82	1402	(E)-Oct-3-en-2-one	N.D.	0.531±0.219	N.D.	N.D.	0.184±0.03								
83	1489	2-Decanone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.162±0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
84	1584	3-Methylcyclohex-2-en-1-one	N.D.	0.171±0.114	N.D.	N.D.	N.D.								
85	1596	5-Methylloxolan-2-one	N.D.	0.21±0.007	0.255±0.103	N.D.	0.109±0.018	N.D.							
86	1613	Oxolan-2-one	0.455±0.006	N.D.	0.163±0.023	0.154±0.029	0.228±0.092	N.D.	0.642±0.838	0.266±0.013	0.687±0.219	1.375±0.67	0.343±0.066	0.258±0.014	0.221±0.022
87	1688	5-Ethylloxolan-2-one	0.115±0.002	0.146±0.002	0.244±0.029	0.151±0.019	0.149±0.078	0.152±0.013	0.585±0.458	0.339±0.043	0.162±0.021	0.352±0.165	N.D.	0.14±0.015	0.169±0.032
88	>1875	(5S)-5-Pentylloxolan-2-one	N.D.	0.183±0.081	N.D.	N.D.	N.D.								
N-containing compounds															
89	<810	N,N-Dimethylmethanamine	0.065±0.045	0.056±0.018	N.D.	0.064±0.012	0.032±0.011	N.D.	N.D.	0.061±0.015	N.D.	0.244±0.228	0.081±0.039	0.05±0.038	0.012±0.004
90	995	Acetonitrile	N.D.	1.392±0.102	3.495±1.868	2.29±0.64	3.031±1.475	2.048±0.675							
91	1725	Naphthalene	N.D.	0.097±0.004	0.084±0.038	N.D.	0.197±0.108	0.068±0.025	N.D.						
S-containing compounds															
92	<810	Methylsulfanylmethane	0.258±0.192	0.176±0.057	0.116±0.056	0.092±0.015	0.083±0.035	0.137±0.032	0.276±0.336	0.191±0.049	0.176±0.004	0.905±0.628	0.044±0.006	0.081±0.006	0.291±0.1
93	>1875	1,3-Benzothiazole	0.29±0.135	0.611±0.09	0.182±0.034	0.359±0.327	0.599±0.267	0.348±0.084	0.395±0.12	0.202±0.059	0.277±0.115	0.571±0.77	0.28±0.08	0.285±0.013	0.276±0.03
Hydrocarbons															
94	<810	2-Methylprop-1-ene	N.D.	0.043±0.003	0.047±0.011	0.04±0.003	0.076±0.026	0.05±0.006	0.059±0.025	0.033±0.009	0.033±0.005	0.029±0.004	0.026±0.006	0.021±0.003	0.019±0.006
95	<810	Pentane	N.D.												
96	<810	Hexane	N.D.	0.064±0.005	0.051±0.012	0.038±0.006	0.037±0.019	0.028±0.008	0.097±0.129	0.08±0.036	0.115±0.023	0.205±0.075	0.115±0.041	0.139±0.056	0.082±0.039
97	<810	Heptane	0.039±0.004	N.D.	0.053±0.037	0.032±0.002	0.057±0.036	0.05±0.024	0.139±0.201	0.044±0.004	0.057±0.013	0.386±0.165	0.046±0.014	0.081±0.024	0.046±0.004
98	<810	Methylcyclohexane													
99	<810	2-tert-Butylperoxy-2-methylpropane	0.267±0.1	0.088±0.046	0.151±0.07	0.063±0.041	1.31±1.858	N.D.	2.404±4.06	0.143±0.069	0.787±0.464	2.789±1.511	0.566±0.557	1.554±0.925	0.114±0.016
100	<810	Octane	0.17±0.05	N.D.	0.056±0.017	0.075±0.012	N.D.	N.D.	N.D.	0.083±0.011	N.D.	N.D.	0.102±0.024	0.428±0.103	0.086±0.009
101	875	Ethylcyclohexane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.516±0.354	N.D.						
102	959	1-Butoxybutane	1.163±0.527	0.702±0.065	0.808±0.324	0.259±0.059	2.88±3.553	0.934±0.715	5.776±9.205	0.035±0.016	1.631±0.812	6.569±4.542	1.576±1.165	3.233±2.813	0.355±0.024
103	999	Decane	0.121±0.02	N.D.	N.D.	0.026±0.01	0.139±0.176	0.241±0.229	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.47±0.429	N.D.
104	1093	Undecane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.506±2.508	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
105	1198	Dodecane	0.159±0.031	0.108±0.014	0.171±0.079	0.115±0.009	0.632±0.542	0.312±0.203	1.131±1.628	0.164±0.038	N.D.	N.D.	0.383±0.143	0.443±0.384	0.179±0.063
106	1299	Tridecane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.545±0.3	N.D.	0.22±0.232	N.D.	N.D.	0.175±0.086	N.D.	N.D.	N.D.
107	1399	Tetradecane	0.089±0.005	0.156±0.016	0.119±0.062	0.133±0.014	0.162±0.067	0.15±0.025	0.159±0.091	N.D.	N.D.	N.D.	0.209±0.057	N.D.	0.062±0.015
108	1456	1-Chloro-2-(1-chloropropyl)propane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.688±9.274	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
109	1460	1-Chloro-3-(3-chloropropoxy)propane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.413±8.046	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

110	1466	y)propane 2-Chloro-2-(2-chloropropyl-2-yloxy)propane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.518±8.897	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Terpenes																
111	1013	α -Pinene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.201±0.158	N.D.	0.29±0.188	N.D.
112	1018	α -Thujene	N.D.	N.D.	N.D.	0.026±0.005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.512±0.57	1.1±0.857	N.D.	0.191±0.169	N.D.
113	1112	Sabinene	N.D.	N.D.	N.D.	0.016±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.576±0.656	1.429±1.261	N.D.	0.245±0.262	N.D.
114	1157	l-Phellandrene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.041±0.002	0.123±0.05	N.D.	N.D.	N.D.
115	1162	Myrcene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.415±0.485	0.114±0.093	0.447±0.646	0.067±0.021	0.077±0.023	0.518±0.423	0.152±0.106	0.642±0.752	0.073±0.028	
116	1172	α -Terpinene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.187±0.108	0.642±0.455	N.D.	0.091±0.079	N.D.
117	1190	dl-Limonene	0.212±0.042	0.139±0.026	0.31±0.096	0.095±0.018	1.967±2.177	0.464±0.371	1.7±2.451	0.471±0.11	0.675±0.193	3.23±2.326	0.783±0.52	2.149±2.31	0.319±0.124	
118	1198	β -Phellandrene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.205±0.035	0.594±0.25	N.D.	N.D.	N.D.
119	1240	γ -Terpinene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.138±0.13	0.04±0.029	N.D.	N.D.	N.D.	0.316±0.2	1.131±0.792	0.041±0.027	0.252±0.247	0.031±0.014
120	1277	Terpinolene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.065±0.031	0.24±0.169	N.D.	N.D.	N.D.
121	1559	α -Cedrene	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.889±0.881	N.D.
Phenols																
122	>1875	2,6-Ditert-butyl-4-methylphenol	41.516 ±3.348	15.925 ±8.918	23.692 ±8.379	11.198±2.81 8	42.13 ±4.753	39.609 ±11.057	27.722 ±9.572	38.391 ±2.609	15.305 ±2.608	22.999 ±8.069	15.23±1.844	19.436 ±1.551	9.041±3.608	
123	>1875	Phenol	0.028±0.004	N.D.	0.028±0.003	N.D.	0.377±0.157	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.126±0.044	0.082±0.017	N.D.	N.D.	
124	>1875	4-Methylphenol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.046±0.019	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.128±0.064	N.D.	N.D.	N.D.	
125	>1875	3-Methylphenol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.096±0.037	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Pyrazines																
126	1261	2-Methylpyrazine	0.096±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
127	1317	2,5-Dimethylpyrazine	0.066±0.003	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
128	1324	2,6-Dimethylpyrazine	0.07±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

1) 각 화합물의 피크 면적을 내부표준물질의 면적으로 나누어 구한 값의 평균±표준편차

2) N.D. = Not Detected

표 12. 북미산 대두 휘발성 대사체

No.	RI	Volatile Compounds	Relative Peak Area ^D					
			IL	IN	MI	MN	ON	QB
Acids								
1	1445	Acetic acid	2.637±0.079	N.D. ²⁾	N.D.	2.389±0.695	5.617±1.504	N.D.
Alcohols								
2	928	Ethanol	6.584±0.519	N.D.	N.D.	3.026±1.061	N.D.	N.D.
3	1022	Butan-2-ol	0.799±0.045	0.281±0.017	0.481±0.072	0.371±0.082	N.D.	0.364±0.08
4	1098	2-Methylpropan-1-ol	0.104±0.037	0.369±0.054	0.145±0.009	N.D.	N.D.	0.106±0.024
5	1128	1-Methoxypropan-2-ol	N.D.	N.D.	0.592±0.098	N.D.	N.D.	N.D.
6	1150	Butan-1-ol	N.D.	N.D.	N.D.	0.327±0.112	0.272±0.065	N.D.
7	1209	2-Methylbutan-1-ol	N.D.	3.793±0.454	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	1209	3-Methylbutan-1-ol	1.674±0.525	N.D.	N.D.	N.D.	2.89±1.063	N.D.
9	1253	Pentan-1-ol	0.759±0.176	0.124±0.01	0.175±0.063	0.067±0.029	0.571±0.168	N.D.
10	1355	Hexan-1-ol	2.837±0.601	0.432±0.086	1.014±0.567	N.D.	2.456±0.851	N.D.
11	1387	Octan-3-ol	N.D.	0.165±0.111	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	1400	2-Butoxyethanol	0.19±0.044	N.D.	N.D.	0.082±0.023	0.146±0.03	N.D.
13	1447	Oct-1-en-3-ol	2.929±0.28	7.134±0.957	4.16±0.65	N.D.	4.168±1.256	2.481±0.76
14	1492	2-Ethylhexan-1-ol	2.938±0.233	3.151±0.361	1.667±0.163	0.811±0.182	1.696±0.367	2.895±0.269
15	1587	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	0.078±0.024	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	>1686	Phenylmethanol	N.D.	N.D.	N.D.	0.168±0.085	N.D.	N.D.
17	>1686	2,2,4-Trimethylpentane-1,3-diol	N.D.	3.087±0.516	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Aldehydes								
18	1073	Hexanal	2.776±0.713	N.D.	0.932±0.164	0.837±0.463	1.566±0.509	0.259±0.133
19	1180	Heptanal	0.121±0.005	N.D.	N.D.	0.084±0.062	N.D.	N.D.
20	1282	Octanal	N.D.	N.D.	N.D.	0.134±0.157	0.104±0.013	N.D.
21	1389	Nonanal	1.11±0.179	N.D.	0.523±0.036	1.106±0.843	0.721±0.27	0.341±0.424
22	1513	Benzaldehyde	0.082±0.019	N.D.	N.D.	0.094±0.014	N.D.	N.D.
Benzene derivatives								
23	1025	Methylbenzene	N.D.	N.D.	N.D.	0.721±0.533	N.D.	1.178±0.333
24	1118	Ethylbenzene	N.D.	0.079±0.012	N.D.	0.04±0.024	0.208±0.092	0.092±0.001
25	1131	1,2-Dimethylbenzene	N.D.	0.082±0.032	0.135±0.043	0.047±0.032	0.349±0.143	0.082±0.006
26	1170	1,3-Dimethylbenzene	0.078±0.022	N.D.	N.D.	N.D.	0.239±0.085	0.049±0.012
Esters								
27	866	Ethyl acetate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.039±0.015	N.D.
28	1140	Butyl propanoate	N.D.	N.D.	N.D.	0.083±0.048	N.D.	N.D.
29	1215	Butyl butanoate	N.D.	N.D.	N.D.	0.252±0.16	N.D.	N.D.
30	>1686	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	N.D.	21.51±4.828	0.151±0.017	0.107±0.06	0.164±0.067	0.093±0.014
31	>1686	Txib	N.D.	124.322±16.885	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Furan derivatives								
32	938	2-Ethylfuran	0.142±0.078	0.33±0.055	N.D.	0.279±0.08	0.395±0.042	0.085±0.005
33	1227	2-Pentylfuran	0.098±0.011	0.083±0.015	0.063±0.018	0.031±0.013	0.149±0.025	0.022±0.011
Ketones								

34	886	Butan-2-one	N.D.	0.065±0.016	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	964	2-Pentanone	N.D.	0.34±0.044	N.D.	N.D.	0.268±0.078	N.D.
36	1177	Heptan-2-one	N.D.	0.123±0.013	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	1249	Octan-3-one	0.088±0.055	2.153±0.083	0.14±0.064	N.D.	N.D.	0.456±0.177
38	1598	4-Methyloxolan-2-one	0.27±0.028	N.D.	0.238±0.028	N.D.	0.631±0.133	N.D.
39	1612	Oxolan-2-one	0.468±0.052	0.086±0.05	N.D.	0.379±0.102	0.701±0.106	N.D.
40	1686	5-Ethyloxolan-2-one	N.D.	N.D.	N.D.	0.137±0.039	N.D.	N.D.
N-containing compounds								
42	<774	N,N-Dimethylmethanamine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.023±0.005	N.D.
S-containing compounds								
43	>1686	1,3-Benzothiazole	0.244±0.138	0.322±0.112	0.2±0.041	0.101±0.01	0.295±0.143	0.093±0.072
Hydrocarbons								
44	774	Octane	N.D.	0.077±0.024	N.D.	0.036±0.026	0.042±0.012	0.051±0.011
45	892	Nonane	N.D.	0.068±0.023	0.049±0.02	0.045±0.018	N.D.	0.042±0.008
46	997	Decane	N.D.	0.073±0.077	N.D.	N.D.	0.158±0.088	0.094±0
47	1196	Dodecane	0.21±0.034	N.D.	0.172±0.024	0.092±0.038	0.185±0.068	N.D.
48	1397	Tetradecane	N.D.	N.D.	0.167±0.093	0.194±0.145	N.D.	N.D.
Terpenes								
49	1165	Cumene	N.D.	N.D.	N.D.	0.061±0.01	N.D.	N.D.
50	1188	dl-Limonene	0.112±0.048	N.D.	0.095±0.059	N.D.	0.204±0.127	N.D.
Phenols								
51	>1686	Phenol	N.D.	N.D.	N.D.	0.046±0.012	N.D.	N.D.
Pyrazines								
52	1258	2-Methylpyrazine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.063±0.011	N.D.

1) 각 화합물의 피크 면적을 내부표준물질의 면적으로 나누어 구한 값의 평균±표준편차

2) N.D. = Not Detected

- 대두의 원산지별 휘발성 대사체를 분석한 결과, 국내산 대두는 총 86개, 중국산 대두는 128개, 북미산 대두는 52개의 성분이 동정되었다.
 - 국내산 대두를 분석한 결과 Acid류는 2종, Alcohol류는 25종, Aldehyde류는 9종, Benzene류는 6종, Ester류는 4종, Furan류는 6종, Ketone류는 13종, 질소 함유한 화합물은 4종, 황을 함유한 화합물은 2종, Hydrobarbon류는 9종, Terpene류는 6종으로 총 86개의 성분이 동정되었다. 국내산 대두에서 주로 검출된 성분은 2-ethylhexan-1-ol, propan-2-one, butan-2-one, nonanal, hexanal 등이 있다.
 - 중국산 대두를 분석한 결과 Acid류는 2종, Alcohol류는 26종, Aldehyde류는 13종, Benzene류는 8종, Ester류는 14종, Furan류는 4종, Ketone류는 21종, 질소 함유한 화합물은 3종, 황을 함유한 화합물은 2종, Hydrobarbon류는 17종, Terpene류는 11종, Phenol류는 4종, Pyrazine류는 3종으로 총 128개의 성분이 동정되었다. 중국산 대두에서 주로 검출된 성분은 acetic acid, ethanol, butan-1-ol, 2-ethylhexan-1-ol, hexanal, nonanal, methyl benzene, butyl acetate, butyl propanoate, butyl prop-2-enoate, butyl butanoate, propan-2-one, 2,6-ditert-butyl-4-methylphenol 등이 있다. 중국산 시료의 경우 다른 시료와 비교했을 때 가장 많은 성분이 동정되었고, 정량 된 휘발성 대사체의 양도 가장 많음을 확인할 수 있었다.
 - 북미산 대두를 분석한 결과 Acid류는 1종, Alcohol류는 16종, Aldehyde류는 5종, Benzene류는 4종, Ester류는 5종, Furan류는 2종, Ketone류는 9종, 질소 함유한 화합물은 1종, 황을 함유한 화합물은 1종, Hydrobarbon류는 5종, Terpene류는 2종, Phenol류는 1종으로 총 52개의 성분이 동정되었다. 중국산 대두에서 주로 검출된 성분은 acetic acid, ethanol, oct-1-en-3-ol, 2-ethylhexan-1-ol 등이 있다.
 - Hexanal은 대부분의 시료에서 검출된 성분으로 linoleic acid가 lipoxygenase에 의해 분해되어 생성된 것으로 사료되며, 식품에 미량 존재하더라도 이취를 나타낸다(Hildebrand, D. F., 1989). 또한, hexanoic acid는 FULO 시료 (중국산)에서만 검출이 되었는데, hexanal이 산화하여 생성된 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 2014).
- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 PLS-DA 분석 결과는 각각 그림 20, 21, 22와 같다.

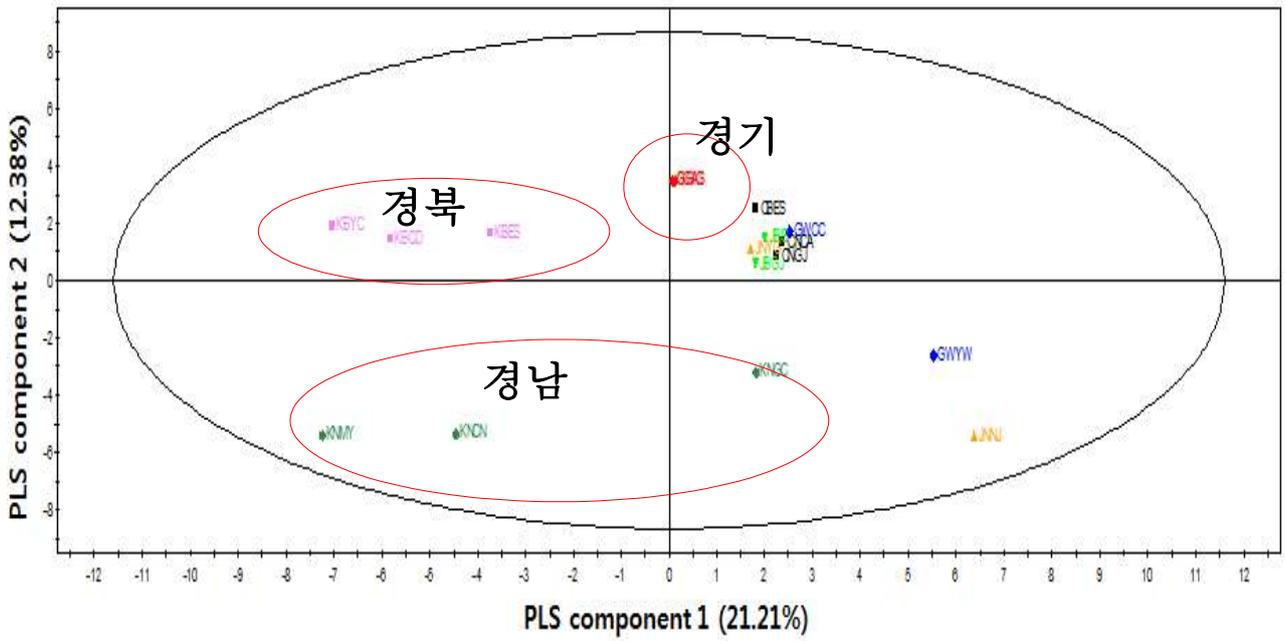


그림 20. 국내산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

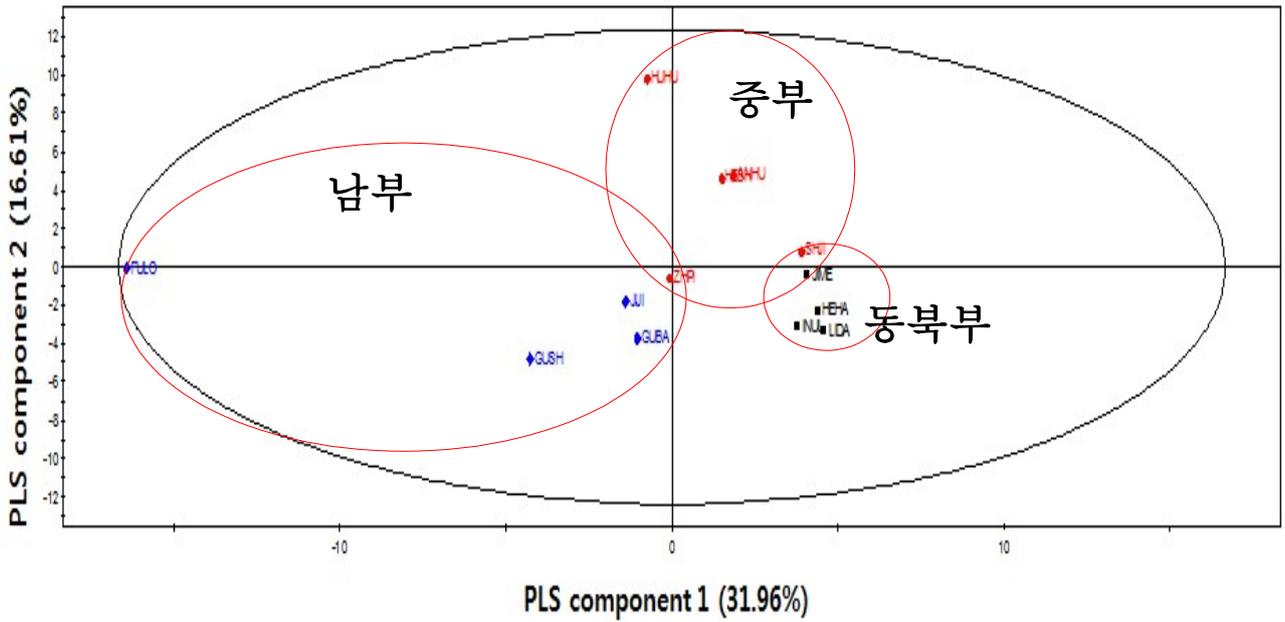


그림 21. 중국산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

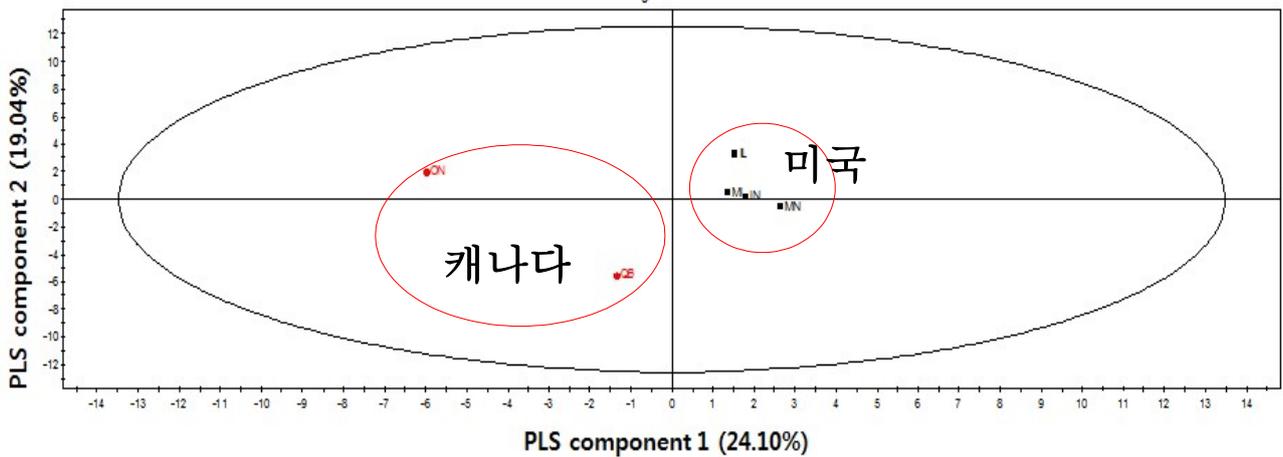


그림 22. 북미산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 휘발성 대사체로 PLS-DA 분석을 수행한 결과 국내산 대두의 PLS component 1은 21.21%, PLS component 2는 12.38%의 설명력을 나타내어 총 33.59%를 설명하였다. 중국산 대두는 PLS component 1은 31.96%, PLS component 2는 16.61%의 설명력을 나타내어 총 48.57%를 설명하였고, 북미산 대두는 PLS component 1은 24.10%, PLS component 2는 19.04%의 설명력을 나타내어 총 43.14%를 설명하였다.
- PLS-DA 분석을 통해 VIP list를 얻어 PLS component 1과 PLS component 2의 양과 음의 방향에 영향을 미치는 주요 성분을 추출하였다. 보통 VIP value가 1.0 이상일 경우 유의성이 있다고 보기 때문에 VIP가 1.0 이상인 휘발성 대사체를 선택하여 표 13, 14, 15에 나타내었다.

표 13. 국내산 대두 휘발성 대사체 Variable Important Plot (VIP) list

Volatile metabolites	VIP value
Methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	1.72
Furan	1.49
3-Methylfuran	1.38
Pentane	1.36
2,5-Dimethylhexan-2-ol	1.35
1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene	1.35
Dodecane	1.35
1-Methyl-3-propan-2-ylbenzene	1.33
Tetradecane	1.30
Ethenylbenzene	1.29
3-Methylbutan-1-ol	1.27
Methyl acetate	1.27
Pentan-1-ol	1.26
2-Phenylethanol	1.24
1,3-Benzothiazole	1.24
Hexan-1-ol	1.22
dl-Limonene	1.22
Hexanal	1.21
2-Pentanone	1.20
2-Butoxyethanol	1.19
Oxolan-2-one	1.17
Methylsulfanylmethane	1.16
(2R,3S)-Butane-2,3-diol	1.16
Heptanal	1.16
2-Methylprop-1-ene	1.15
Methylcyclohexane	1.12
N,N-Dimethylmethanamine	1.12
2-Decanone	1.12
Butan-2-one	1.11
Dichloromethane	1.10
2-Methylprop-2-enal	1.10
Ethanol	1.09
2-(Phenoxy)ethanol	1.06
Azulene	1.05
1-Phenylethanol	1.05
Octane	1.05
Phenylmethanol	1.03
Octan-1-ol	1.02
Pentylcyclopentane	1.02
Pyridine	1.02
Propan-2-one	1.01
6-Methylhept-5-en-2-one	1.01
Phenol	1.01
Ethyl acetate	1.01

표 14. 중국산 대두 휘발성 대사체 Variable Important Plot (VIP) list

Volatile metabolites	VIP value
1-Methoxypropan-2-ol	1.78
Acetonitrile	1.69
Acetaldehyde	1.53
Heptan-4-ol	1.51
2-Ethylhexan-1-ol	1.47
Butan-1-ol	1.47
Methyl acetate	1.47
(E)-Hept-2-enal	1.46
3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	1.38
(E)-Non-2-enal	1.37
Heptan-4-one	1.34
2-Methylprop-1-ene	1.31
BHT	1.25
3-Methoxy-3-methylbutan-1-ol	1.25
Dichloromethane	1.25
1-Methoxypropan-2-one	1.24
Octane	1.20
N,N-Dimethylmethanamine	1.19
Hexane	1.19
γ -Hexalactone	1.19
3-Methylheptan-4-ol	1.16
Propane-1,2-diol	1.15
1-Methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]benzene	1.15
5-Methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	1.14
2,5-Dimethylhexan-2-ol	1.14
3-Methylheptan-4-one	1.13
Acetic acid	1.11
(E)-Hex-2-enal	1.11
2-Pentylfuran	1.11
Myrcene	1.11
1,1-Dimethylsilanediol	1.10
Hexan-1-ol	1.09
Butan-2-one	1.09
Butyl butanoate	1.07
Styrene	1.07
Benzaldehyde	1.06
3-Methylcyclohex-2-en-1-one	1.05
Hexanoic acid	1.05
γ -Nonalactone	1.05
Ethyl acetate	1.05
α -Pinene	1.04
2-Methylpyrazine	1.04
2,5-Dimethylpyrazine	1.04
2,6-Dimethylpyrazine	1.04
(E)-Oct-3-en-2-one	1.02
Dodecane	1.02
2-Methylprop-2-enal	1.02
Phenylmethanol	1.01
dl-Limonene	1.01
Ethanol	1.01
Methylsulfanylmethane	1.01
Butanal	1.00
Octan-1-ol	1.00
α -Cedrene	1.00

표 15. 북미산 대두 휘발성 대사체 Variable Important Plot (VIP) list

Volatile metabolites	VIP value
Decane	1.92
Chloroform	1.81
Ethylbenzene	1.80
1,3-Dimethylbenzene	1.59
N,N-Dimethylmethanamine	1.49
Ethyl acetate	1.49
2-Methylpyrazine	1.49
1,2-Dimethylbenzene	1.47
Methylbenzene	1.43
Butan-2-ol	1.36
Benzaldehyde	1.15
Heptanal	1.15
Tetradecane	1.15
3-Methylbutan-1-ol	1.11
4-Methyloxolan-2-one	1.10
Ethanol	1.09

- 더욱 정확한 결과 값을 얻기 위해 국내산, 중국산, 북미산 대두 각각 VIP value가 1.0인 성분들만 추출하여 PLS-DA 분석을 실시하였다 (그림 23, 24, 25).

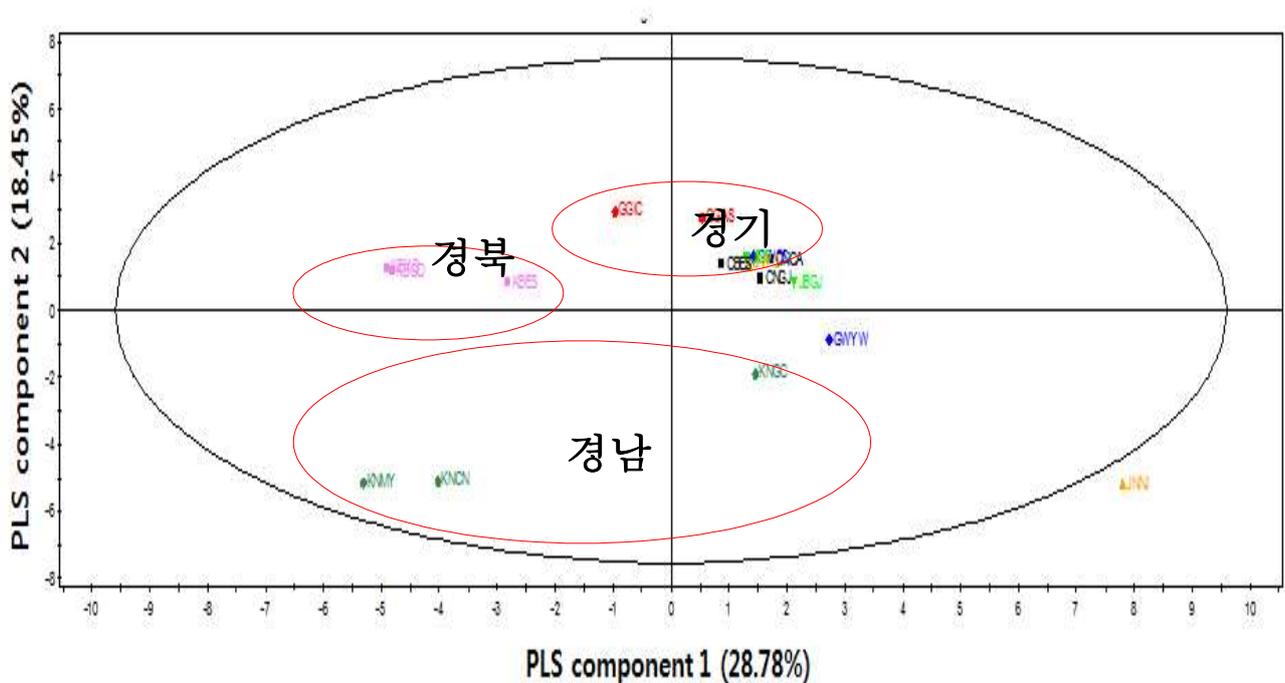


그림 23. VIP > 1.0 성분으로 처리한 국내산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

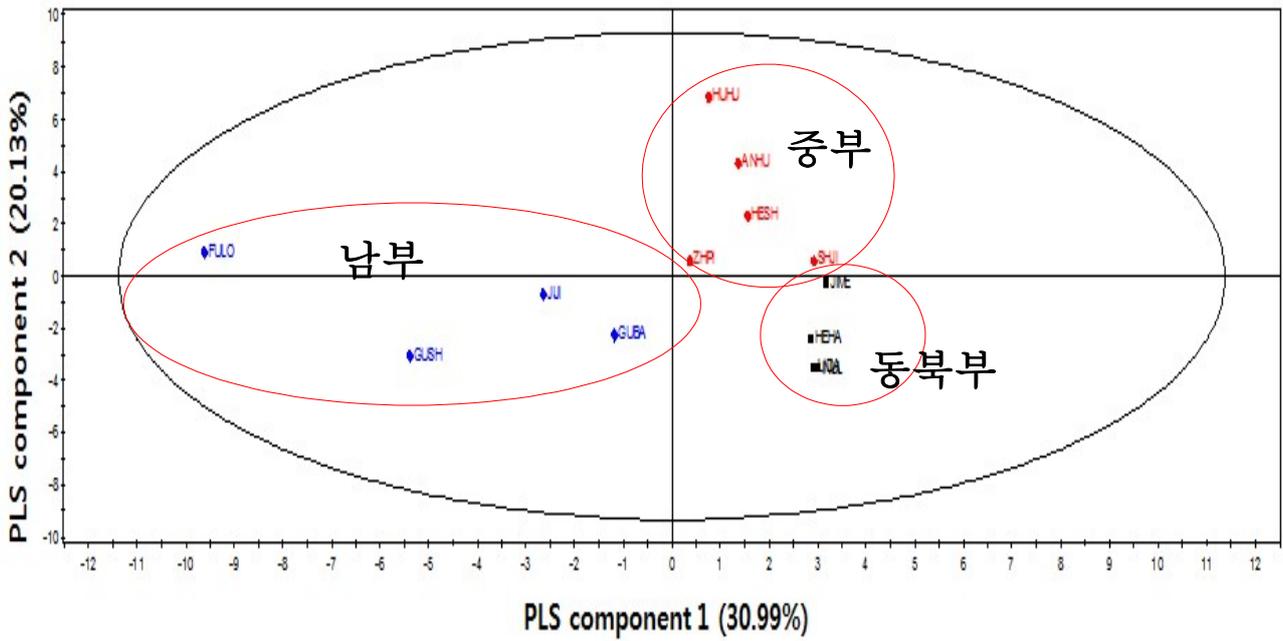


그림 24. VIP > 1.0 성분으로 처리한 중국산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

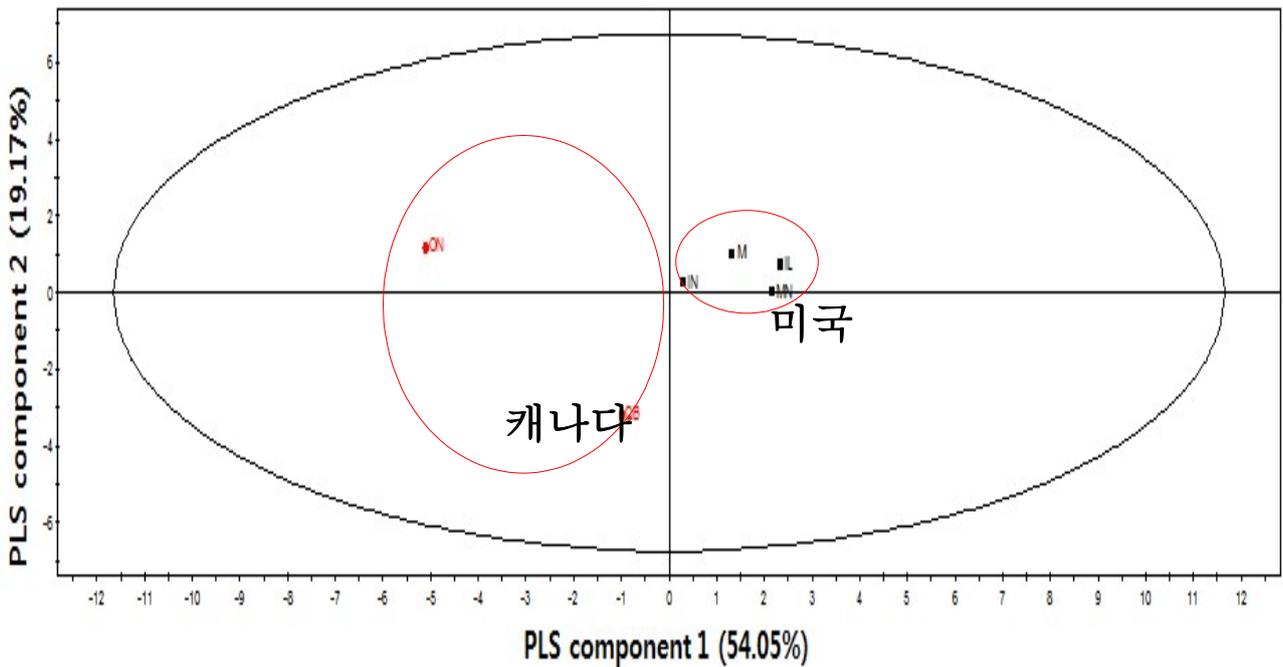


그림 25. VIP > 1.0 성분으로 처리한 북미산 대두 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 휘발성 대사체로 PLS-DA 분석을 수행한 결과 국내산 대두의 PLS component 1은 28.78%, PLS component 2는 18.45%의 설명력을 나타내어 총 47.23%를 설명하였다. 중국산 대두는 PLS component 1은 30.99%, PLS component 2는 20.13%의 설명력을 나타내어 총 51.12%를 설명하였고, 북미산 대두는 PLS component 1은 54.05%, PLS component 2는 19.17%의 설명력을 나타내어 총 73.22%를 설명하였다.

- VIP 값이 1.0 이상인 휘발성 대사체로만 PLS-DA 분석을 실시하였을 때 세 가지 모두 설명력이 크게 증가하였다. 국내산 대두의 경우 지역별 구분이 잘 되지는 않았지만 중국산, 북미산의 경우 분리도 더 잘 되었음을 확인할 수 있다.
- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 원산지 판별을 위해 PLS-DA 분석을 실시하였다 (그림 26).

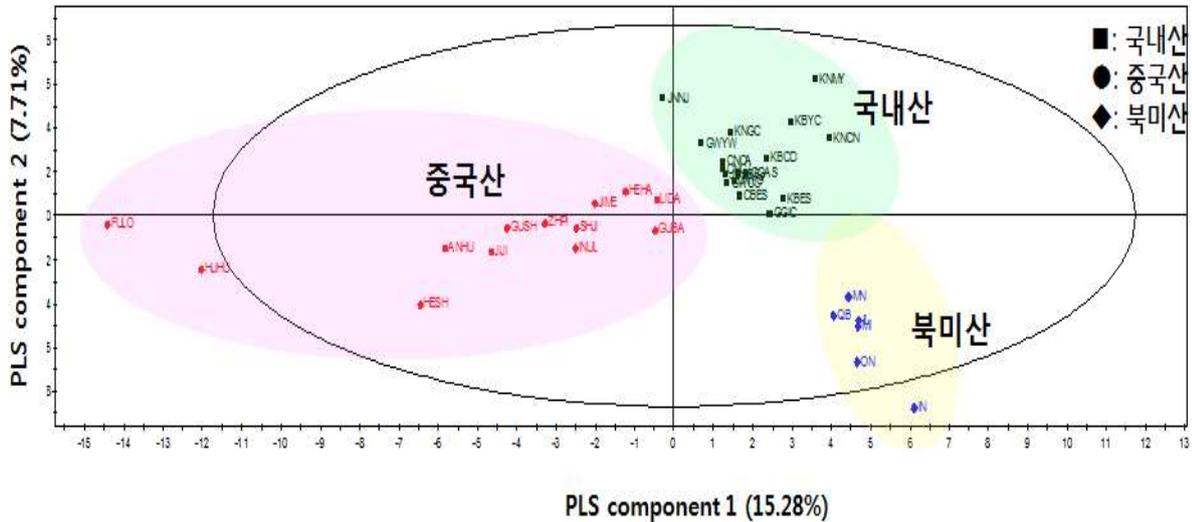


그림 26. 대두의 원산지별 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot

- 국내산, 중국산, 북미산 대두의 휘발성 대사체로 PLS-DA 분석을 수행한 결과 PLS component 1은 15.28%, PLS component 2는 7.71%의 설명력을 나타내어 총 22.99%를 설명하였다.
- 중국산 대두는 PLS component 1의 기준으로 음의 방향에 위치하고 있으며, 북미산 대두는 PLS component 1의 기준으로 양의 방향, PLS component 2의 기준으로 음의 방향에 위치한다. 그리고 국내산 대두는 PLS component 1을 기준으로 양의 방향, PLS component 2를 기준으로 양의 방향에 위치한다. 중국산 대두는 PLS component 1을 기준으로 국내산 및 북미산 대두와 차이를 보이며, 국내산과 북미산 대두는 PLS component 2를 기준으로 서로 차이를 보인다.
- 시료 수집 지역의 범위에 따라 각 시료 간 분포도 차이를 보임을 확인할 수 있다. 비교적 넓은 지역에서 확보한 중국산 대두의 경우 국내산, 북미산보다 시료가 퍼져있다.
- VIP가 1.0 이상인 휘발성 대사체를 선택하여 표 16에 나타내었다.
- 동정된 모든 성분으로 통계처리를 하였을 때 설명력이 비교적 낮았다. 이를 보완하기 위해 VIP value가 1.0 이상인 성분으로 PLS-DA 분석을 실시하였다 (그림 27).

표 16. 대두의 원산지별 휘발성 대사체 Variable Important Plot (VIP) list

Volatile metabolites	VIP value
2-Methylprop-1-ene	2.13
Oct-1-en-3-ol	2.11
Nonane	1.99
Heptane	1.88
1,3-Dimethylbenzene	1.87
Heptan-4-ol	1.85
2,5-Dimethylhexan-2-ol	1.81
gamma-Hexalactone	1.79
Methylbenzene	1.78
Butyl acetate	1.77
Butyl propanoate	1.77
3-Methylheptan-4-one	1.74
1,2-Dimethylbenzene	1.65
2-Ethylhexan-1-ol	1.64
1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	1.63
1,2,3-Trimethylbenzene	1.57
4-Methyloxolan-2-one	1.56
2-Methylfuran	1.56
1-Methoxypropan-2-ol	1.48
1-Butoxybutane	1.47
Propan-2-one	1.45
Heptan-4-one	1.43
Hexane	1.41
2-tert-Butylperoxy-2-methylpropane	1.38
Myrcene	1.35
2-Methylprop-2-enal	1.33
Ethenylbenzene	1.32
Octanal	1.32
Octan-3-one	1.25
1-Methyl-3-propan-2-ylbenzene	1.25
2-Methylpropan-1-ol	1.24
Benzaldehyde	1.23
Methylsulfanylmethane	1.23
Ethyl hexanoate	1.21
Acetonitrile	1.19
Decane	1.17
Methyl acetate	1.16
(E)-Hept-2-enal	1.15
Naphthalene	1.14
(E)-Non-2-enal	1.04
1,1-Dimethylsilanediol	1.04
Ethyl acetate	1.02
Acetic acid	1.02
Octan-2-one	1.02
Dichloromethane	1.02

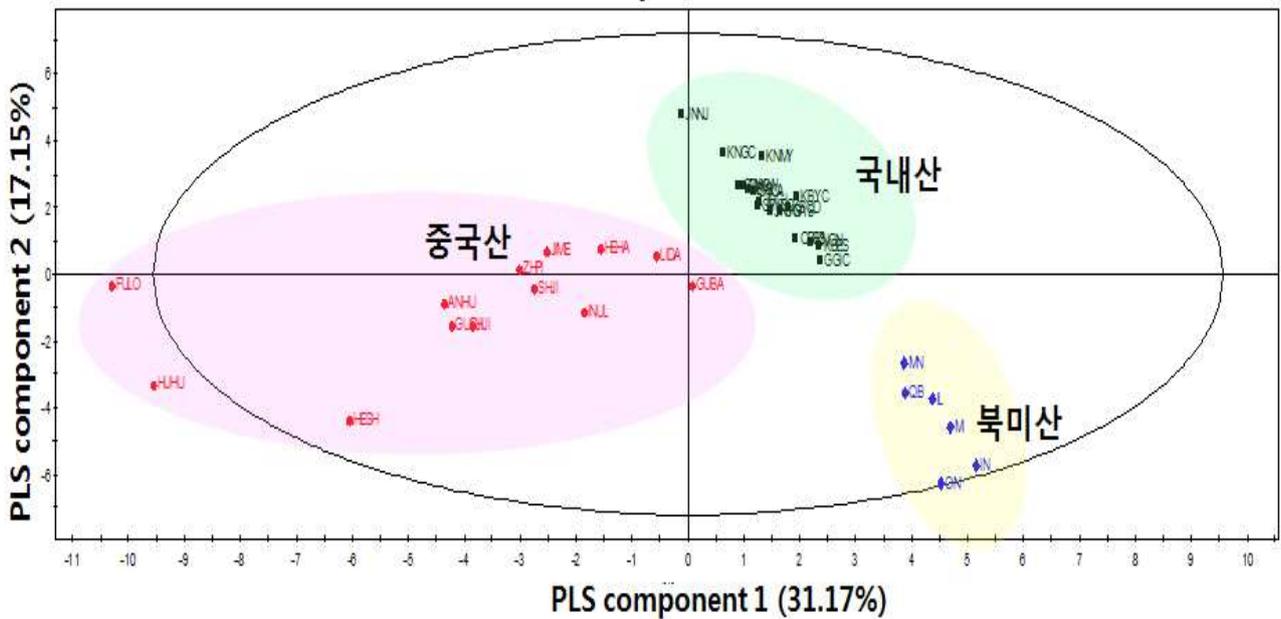


그림 27. VIP > 0.1 성분으로 처리한 PLS-DA

- 이전 결과와 다르게 PLS-DA 분석을 수행한 결과 PLS component 1은 31.17%, PLS component 2는 17.15%의 설명력을 나타내어 총 48.32%를 설명하였다.
- PLS component 1의 양의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 oct-1-en-3-ol, nonane, 1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexane, 4-methyloxolan-2-one, octan-3-one 등이었다.
- PLS component 1의 음의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 3-methylheptan-4-one, butyl propanoate, 1,2,3-trimethylbenzene, 1,3-dimethylbenzene, heptan-4-ol 등이었다.
- PLS component 2의 양의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 heptane, 2-methylprop-1-ene, 2,5-dimethylhexan-2-ol, 2-ethylhexan-1-ol, ethylbenzene 등이었다.
- PLS component 2의 음의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 oct-1-en-3-ol, 1,2-dimethylbenzene, nonane, 1-methyl-4-prop-1-en-2-cyclohexane, 4-methyloxolan-2-one 등이었다.
- 각 대두 시료마다 휘발성 대사체 구성에 차이를 보이는 이유는 대두의 재배 환경의 영향 (Grieshop et al., 2001) 때문이거나, 대두의 주요 지방산 구성 차이 (Oomah et al., 2007) 때문일 것으로 사료된다.
- 그 중 북미산 대두 시료 분리에 중요하게 작용한 성분인 oct-1-en-3-ol의 경우 선행연구에 따르면 lipxygenase에 의해 다중불포화지방산이 산화되어 생긴 생성물로 보고되어 있다 (McLeod et al., 1988).

(4) 원산지에 따른 대상 농산물 참깨의 대사체 지문 분석

(가) 참깨의 대사체 분석을 위한 전처리 조건에 따른 비교

- 참깨의 휘발성 성분의 SPME를 이용한 추출 방법 및 GC/MS 분석결과를 기반으로 최적 조건을 설정하였다.
- SPME fiber : DVB/CAR/PDMS, PDMS (Supelco)
- roasting condition : 40°C, 100°C, 150°C, 180°C / 23분

① SPME 추출

- 시료는 headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) 방법으로 추출하였다. HS-SPME는 시료를 일정한 온도로 유지시켜 headspace 상으로 휘발성 성분을 이동시키고 이를 polymer로 코팅된 fiber를 이용하여 추출하는 방법으로, 비교적 적은 양의 시료도 분석 가능한 방법이다. 코팅된 물질에 따라 각기 다른 선택성을 가지기 때문에 참깨의 휘발성 성분을 위한 최적의 추출 방법을 찾기 위해 두 종류의 fiber를 사용하여 비교 분석하였다.
- fiber의 종류는 DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane), PDMS (Polydimethylsiloxane) 두 가지를 사용하여 참깨의 휘발성 대사체 분석에 적합한 조건을 찾았다.
- 휘발성 성분분석을 위한 최적의 전처리 온도를 찾기 위해 각 40°C, 100°C, 150°C, 180°C의 네 구간으로 나누어 23분간 roasting하며 roasting 온도별 휘발성 대사체의 차이를 보았으며, 온도 제어의 재현성을 높이기 위해 GC/MS에 부착된 multi-purpose sampler (MPS)를 사용하였다.
- 시료는 2018년 전라남도 해남군 현산면에서 재배한 참깨를 구매하여 실험하였다.
- 20 mL screw vial에 참깨 시료 4.0 g을 넣고 MPS에서 vial 1개씩 23분간 roasting하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20 mL vial을 40°C, 100°C, 150°C, 180°C에서 250 rpm으로 agitating하며 23분간 평형을 이루며 휘발성 성분을 흡착, 230°C에서 5분간 탈착하였다.
- color chart와 대조하였을 때, 100°C로 roasting한 참깨에 비교하여 150°C에서 roasting한 참깨의 color level이 두 단계 상승하였으며, 180°C에서 roasting한 참깨는 150°C로 roasting한 참깨보다 color level이 세 단계 상승하여 roasting temperature에 따라 가열반응이 진행된 것을 확인할 수 있었다 (그림 28).

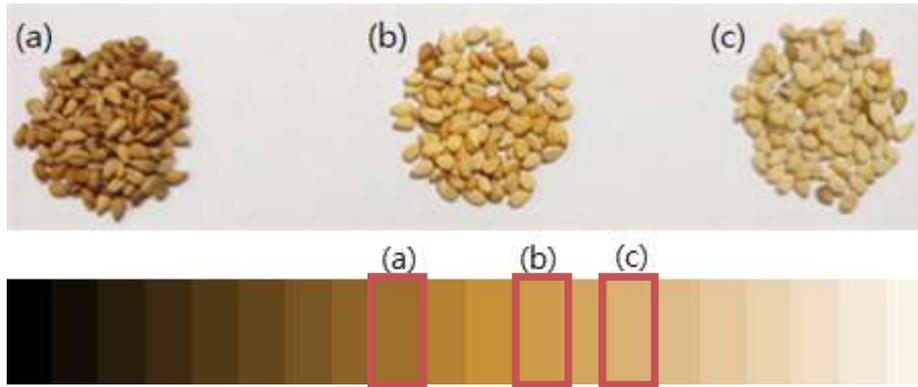


그림 28. (a)180°C, (b)150°C, (c)100°C 로 roasting한 참깨시료의 color chart 비교사진.

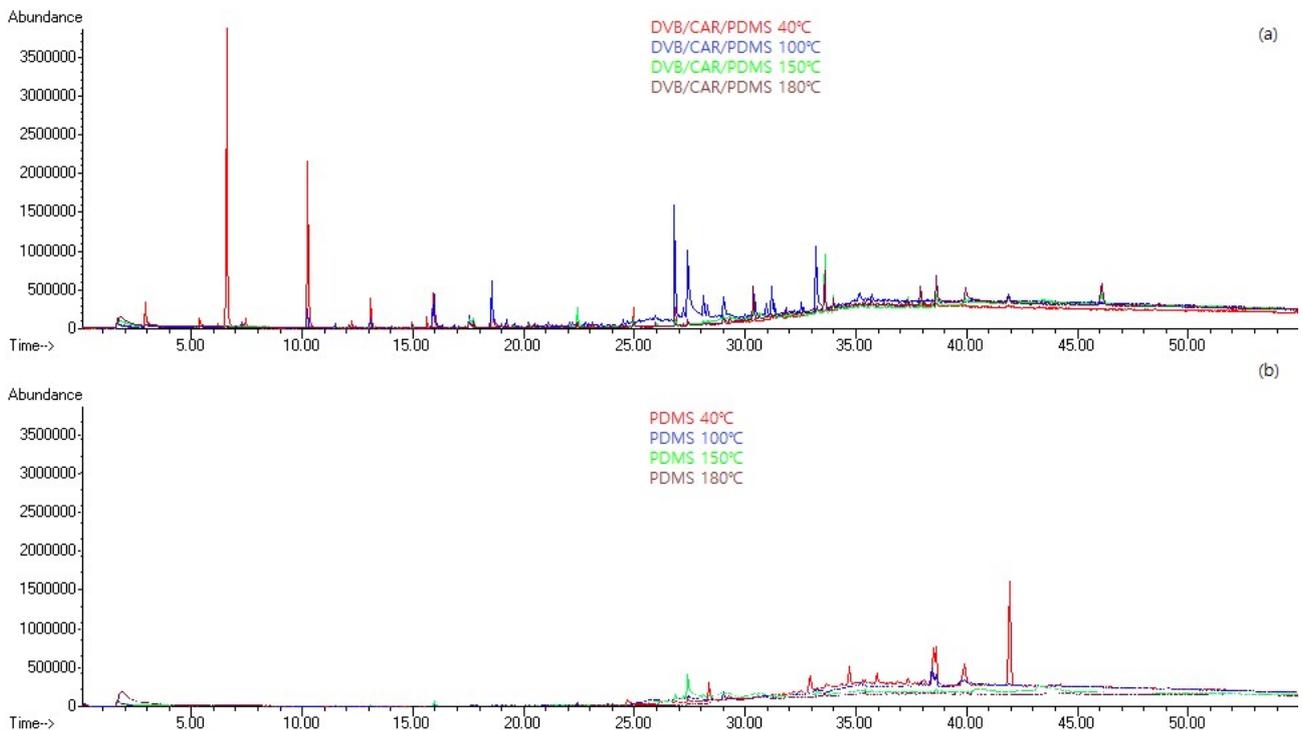


그림 29. SPME fiber의 종류와 roasting온도를 달리한 참깨 시료의 휘발성분 total ions chromatograms.

(a) SPME fiber : DVB/CAR/PDMS, roasting temp. : 40°C, 100°C, 150°C, 180°C

(b) SPME fiber : PDMS, roasting temp. : 40°C, 100°C, 150°C, 180°C

② GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

- SPME 법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기 성분은 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 HP-5MS (length 30m × inner diameter 0.25mm × film thickness 0.25 μm, Agilent Technologies)를 사용하였다. Oven은 40°C 에서 3분간 유지하고, 200°C 까지 5°C/min으로 온도를 높인 후 230°C 까지 7°C/min의 속도로 온도를 높여 분석하였다.

- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, split (10:1) mode로 설정하였다. mass spectra는 ionization energy는 70eV로, mass scan range는 35~350 a.m.u., mass scan rate은 4.5 scan/sec으로 설정하였다.

③ 휘발성분의 정성 및 정량

- SPME법으로 추출한 참깨의 휘발성 대사체는 mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다. 정량 결과는 각 peak의 area를 전체 peak area의 합으로 나눈 값 (%)을 사용하였다 (표 17).
- acetic acid와 hexanoic acid는 네 가지 온도에서 모두 검출되었고, 40°C 에서 검출되지 않았던 2-methoxy-4-vinylphenol이 100°C, 150°C, 180°C 에서 검출되었다. nonanoic acid, pentanoic acid, octanoic acid는 40°C 와 100°C 에서는 검출되었으나 150°C 와 180°C 에서 검출되지 않았고, furancarboxaldehyde, pyrrole-2-aldehyde, hexadecanoic acid, octadecenoic acid, benzofuran, 2(1H)-pyridinone, 2-furanmethanol은 150°C 와 180°C 에서만 검출되었다. 고온 (150°C, 180°C)에서 roasting한 참깨의 경우 DVB/CAR/PDMS fiber를 사용하였을 때, PDMS fiber를 사용하여 추출했을 때보다 더 많은 종류의 휘발성 대사체들이 검출되었다.
- 참깨의 주요 휘발성 성분인 2-methylpyrazine이 40°C, 100°C, 150°C까지는 소량 검출되었고 180°C에서 급증하는 것을 확인하였다. 또한, roasting 과정 중에 screw cap의 septa가 고온으로 인해 부풀어 오르면서 휘발성 성분이 누출된 것을 확인하여 분석에 앞서 시료의 수분 제어를 위한 건조 전처리 과정과 밀봉이 가능한 crimp cap으로의 교체가 필요함을 확인하였다. 기기설정이 가능한 상한 온도 200°C보다 낮은 온도인 180°C에서 roasting 시간을 조절하며 참깨의 대사체 분석에 최적화된 온도와 시간을 확인하였다 (표 18).

표 17. SPME PDMS와 DVB/CAR/PDMS fiber의 추출 효율 비교(roasting temp. 150°C, 180°C)

No.	CAS #	possible volatile compounds	peak area			
			150°C		180°C	
			PDMS	DVB/CAR/PDMS	PDMS	DVB/CAR/PDMS
Alcohols						
1	000533-31-3	1,3-benzodioxol-5-ol	N.D.	9.92E+06	N.D.	2.28E+07
Aldehydes						
2	000066-25-1	hexanal	5.10E+05	N.D.	N.D.	N.D.
3	000124-13-0	octanal	2.55E+05	N.D.	N.D.	N.D.
4	000124-19-6	nonanal	2.15E+06	N.D.	N.D.	N.D.
5	000100-52-7	benzaldehyde	N.D.	3.30E+05	N.D.	N.D.
6	000121-33-5	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	N.D.	5.40E+06	N.D.	N.D.
7	001192-79-6	5-methyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	1.70E+06
8	001003-29-8	1H-pyrrole-2-carbaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	1.56E+07
Acids						
9	000064-19-7	acetic acid	1.83E+05	2.40E+06	4.50E+05	3.19E+06
10	000142-62-1	hexanoic acid	N.D.	3.68E+06	N.D.	1.47E+06
11	000057-10-3	hexadecanoic acid	N.D.	N.D.	N.D.	5.59E+05
12	013481-95-3	methyl (E)-octadec-10-enoate	N.D.	N.D.	N.D.	3.77E+06
13	057396-98-2	methyl (E)-octadec-7-enoate	N.D.	N.D.	N.D.	1.58E+07
14	000112-63-0	methyl (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate	N.D.	N.D.	N.D.	1.16E+07
15	000079-09-4	propanoic acid	N.D.	N.D.	N.D.	1.23E+06
16	000112-80-1	(Z)-octadec-9-enoic acid	2.16E+06	N.D.	1.06E+06	N.D.
17	000112-79-8	(E)-octadec-9-enoic acid	5.02E+06	N.D.	N.D.	N.D.
18	000112-39-0	methyl hexadecanoate	N.D.	N.D.	N.D.	1.70E+06
S-containing compounds						
19	000095-16-9	1,3-benzothiazole	N.D.	N.D.	N.D.	1.88E+06
Pyrazins						
20	000109-08-0	2-methylpyrazine	N.D.	N.D.	N.D.	7.59E+05
Phenols						
21	007786-61-0	4-ethenyl-2-methoxyphenol	N.D.	N.D.	8.39E+06	1.56E+07
Furan derivatives						
22	000620-02-0	5-methylfuran-2-carbaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	1.67E+06
23	000496-16-2	2,3-dihydro-1-benzofuran	N.D.	N.D.	N.D.	3.81E+06

표 18. DVB/CAR/PDMS fiber를 사용하여 추출한 찹깨의 휘발성 대사체

No.	CAS #	possible volatile compounds	peak area			
			40℃	100℃	150℃	180℃
N-containing compounds						
1	000109-08-0	2-methylpyrazine	1.14E+05	1.63E+05	1.50E+05	8.90E+05
2	001072-83-9	1-(1H-pyrrol-2-yl)ethanone	N.D.	N.D.	N.D.	1.22E+06
3	000626-64-2	1H-pyridin-4-one	N.D.	N.D.	N.D.	1.23E+07
4	001003-29-8	1H-pyrrole-2-carbaldehyde	N.D.	N.D.	4.01E+06	1.52E+07
Acids						
5	000064-19-7	acetic acid	3.62E+06	5.23E+06	3.12E+06	3.02E+06
6	000112-79-8	(E)-octadec-9-enoic acid	N.D.	2.94E+06	2.44E+06	1.84E+06
7	000057-10-3	hexadecanoic acid	1.21E+06	1.34E+06	1.02E+06	1.88E+06
8	000142-62-1	hexanoic acid	9.62E+06	5.51E+07	3.60E+06	1.48E+06
9	000112-05-0	nonanoic acid	N.D.	3.87E+07	N.D.	N.D.
10	000124-07-2	octanoic acid	N.D.	1.80E+06	N.D.	N.D.
11	000109-52-4	pentanoic acid	N.D.	2.85E+06	N.D.	N.D.
26	000097-87-0	butyl 2-methylpropanoic acid	N.D.	3.59E+06	N.D.	N.D.
27	001732-10-1	dimethyl nonanedioic acid	N.D.	3.51E+06	N.D.	N.D.
28	007452-79-1	ethyl 2-methylbutanoic acid	1.19E+08	N.D.	N.D.	N.D.
29	006846-50-0	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoic acid methyl	1.27E+06	3.82E+07	8.82E+05	2.81E+06
30	000112-63-0	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	N.D.	N.D.	4.55E+06	1.14E+07
31	001937-62-8	methyl (E)-octadec-9-enoic acid	N.D.	N.D.	6.89E+06	1.79E+07
32	006149-41-3	methyl 3-hydroxypropanoic acid	N.D.	N.D.	2.40E+06	1.80E+06
33	000110-42-9	methyl decanoic acid	N.D.	2.89E+06	N.D.	N.D.
34	000106-73-0	methyl heptanoic acid	1.38E+07	4.34E+06	N.D.	N.D.
35	000112-39-0	methyl hexadecanoic acid	N.D.	N.D.	6.42E+06	4.18E+06
36	000106-70-7	methyl hexanoic acid	7.17E+07	8.14E+06	N.D.	N.D.
37	001731-84-6	methyl nonanoic acid	1.88E+07	3.00E+07	N.D.	N.D.
38	000111-11-5	methyl octanoic acid	1.96E+07	5.72E+06	N.D.	N.D.
Alcohols						
12	000533-31-3	1,3-benzodioxol-5-ol	N.D.	N.D.	1.01E+07	2.22E+07
13	000098-00-0	furan-2-ylmethanol	N.D.	N.D.	N.D.	7.52E+05
14	000111-27-3	hexan-1-ol	2.09E+06	9.18E+05	N.D.	N.D.
15	000111-87-5	octan-1-ol	N.D.	1.65E+06	N.D.	N.D.
16	000071-41-0	pentan-1-ol	1.37E+06	4.68E+05	N.D.	N.D.
Aldehydes						
17	013019-16-4	2-butyloct-2-enal	N.D.	1.71E+06	N.D.	N.D.
18	000100-52-7	benzaldehyde	N.D.	3.07E+06	N.D.	N.D.
19	000122-78-1	2-phenylacetaldehyde	N.D.	1.60E+06	N.D.	N.D.
20	000121-33-5	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	N.D.	5.97E+06	5.62E+06	4.99E+06
21	000620-02-0	5-methylfuran-2-carbaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	1.19E+06
22	000498-60-2	furan-3-carbaldehyde	N.D.	N.D.	2.71E+06	2.71E+06
23	000098-01-1	furfural	N.D.	N.D.	N.D.	2.76E+06
24	000066-25-1	hexanal	2.03E+06	2.36E+06	N.D.	N.D.
25	000124-19-6	nonanal	N.D.	1.85E+07	N.D.	N.D.
Ketones						
39	000695-06-7	5-ethylloxolan-2-one	N.D.	1.74E+06	N.D.	N.D.
40	000104-61-0	5-pentyloxolan-2-one	N.D.	9.34E+06	N.D.	N.D.

S-containing compounds						
41	000095-16-9	1,3-benzothiazole	3.04E+06	1.15E+07	1.15E+06	1.92E+06
Phenols						
42	007786-61-0	4-ethenyl-2-methoxyphenol	N.D.	8.74E+06	2.31E+07	1.57E+07
Furan derivatives						
43	003777-69-3	2-pentylfuran	N.D.	2.13E+06	N.D.	N.D.

(나) 참깨의 대사체 분석을 위한 분석 방법 별 비교

참깨의 휘발성 성분의 headspace (HS) 추출 방법 및 GC/MS 분석법

- split mode : 10:1
- cryo-focusing : -80°C

① headspace (HS) 추출

- 시료는 HS 방법으로 추출하였다. HS 추출법은 vial에 담긴 시료를 일정한 온도로 유지시켜 headspace 상으로 휘발성 성분을 이동시키고 이를 GC에 주입하여 분석하는 방법으로, 별도의 전처리가 필요하지 않아 비교적 간단한 분석 방법이다. 참깨의 휘발성 성분을 위한 최적의 추출 방법을 찾기 위해 split, splitless mode를 비교하였으며, cryo-trapping을 실시한 시료와 그렇지 않은 시료를 비교하였다.
- split mode 비교 실험에서는 10:1로 split을 준 그룹과 splitless 그룹을 비교하였으며, cryo-trapping을 비교한 실험에서는 액체질소를 사용하여 -80°C로 5분간 trapping한 그룹과 trapping을 거치지 않은 그룹을 비교하였고, 각 3번 반복하여 실험을 수행하였다.
- 시료는 2018년 전라남도 해남군 현산면에서 재배한 참깨를 구매하여 실험하였다.
- 20 mL screw vial에 참깨 시료 4.0g을 넣고 MPS를 사용하여 180°C에서 vial 1개씩 10분간 250 rpm으로 agitating하며 roasting하였다. HD-type 2.5 mL headspace용 syringe (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland)를 사용하였으며, syringe temperature는 150°C로 설정하였고 injection speed는 500 μ L/sec로 하였다.

② GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

- HS 추출법으로 시료의 휘발성 대사체 성분을 추출하여 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 HP-5MS (length 30m \times inner diameter 0.250mm \times film thickness 0.25 μ m, Agilent Technologies)를 사용하였다. Oven은 40°C에서 23분간 유지하고, 200°C까지 6°C/min으로 온도를 높인 후 230°C까지 6°C/min의 속도로 온도를 높여 63.667분간 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, mass spectra는 ionization energy는 70eV로, mass scan range은 35~350 a.m.u.로 하였고, mass scan rate는 4.5 scan/sec으로 설정하여 얻었다.

③ 휘발성분의 정성분석 및 분석조건 비교

- 참깨의 휘발성분의 비교 분석은 targeted analysis로 진행되었으며, mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다.
- splitless mode로 분석한 데이터는 split mode로 분석한 데이터에 비해 초반 분리능이 좋지 않았고, 액체질소를 사용하여 -80℃로 cryo-focusing을 한 경우에는 사용하지 않은 시료와 비교하여 peak abundance의 차이가 크지 않게 나타났다 (그림 30). 시료의 휘발성 대사체 성분의 농도가 비교적 낮고 cryo-trapping의 효과가 미비하기 때문에 주요 성분인 aldehyde류와 phenol류가 높게 검출되는 splitless mode로 cryo-trapping없이 진행하는 것이 효과적일 것으로 사료 된다 (그림 31).
- 참깨 시료를 분석하는 데에 SPME 방법을 사용하는 것이 검출되는 성분의 종류가 더 다양하기 때문에 일정 온도로 roasting한 후에 HS-SPME 방법을 사용하여 추출하는 것이 적합한 것으로 사료 되고, 수분 또한 roasting의 중요한 영향 인자이기 때문에 50℃의 dry oven에서 24시간 동안 건조하여 수분함량을 2.5% 미만으로 조절하는 전처리 조건이 필요할 것으로 판단 된다.

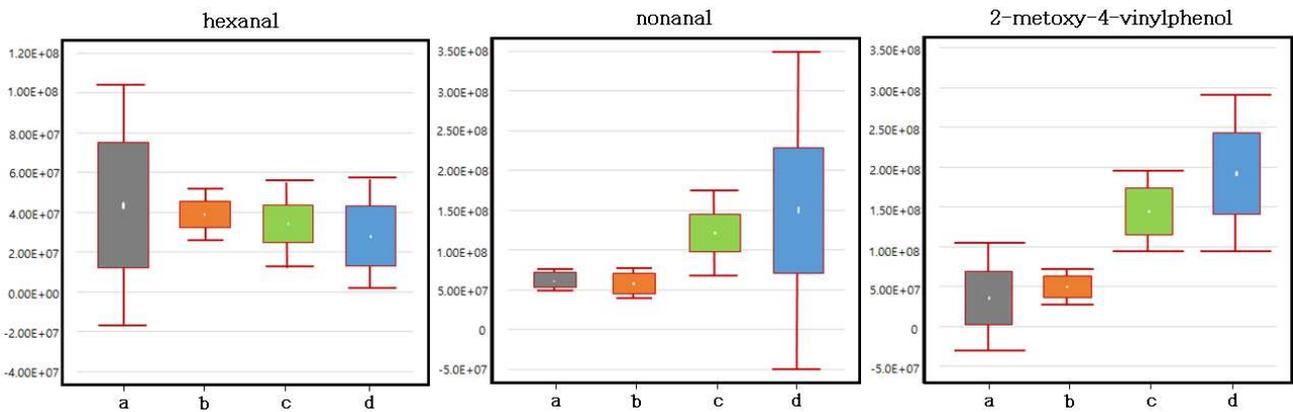


그림 30. 분석 조건을 달리한 참깨 시료의 주요 성분 비교.

- a : split 10:1, cryo-focusing -80℃ 5분, b : split 10:1,
- c : splitless, cryo-focusing -80℃ 5분, d : splitless

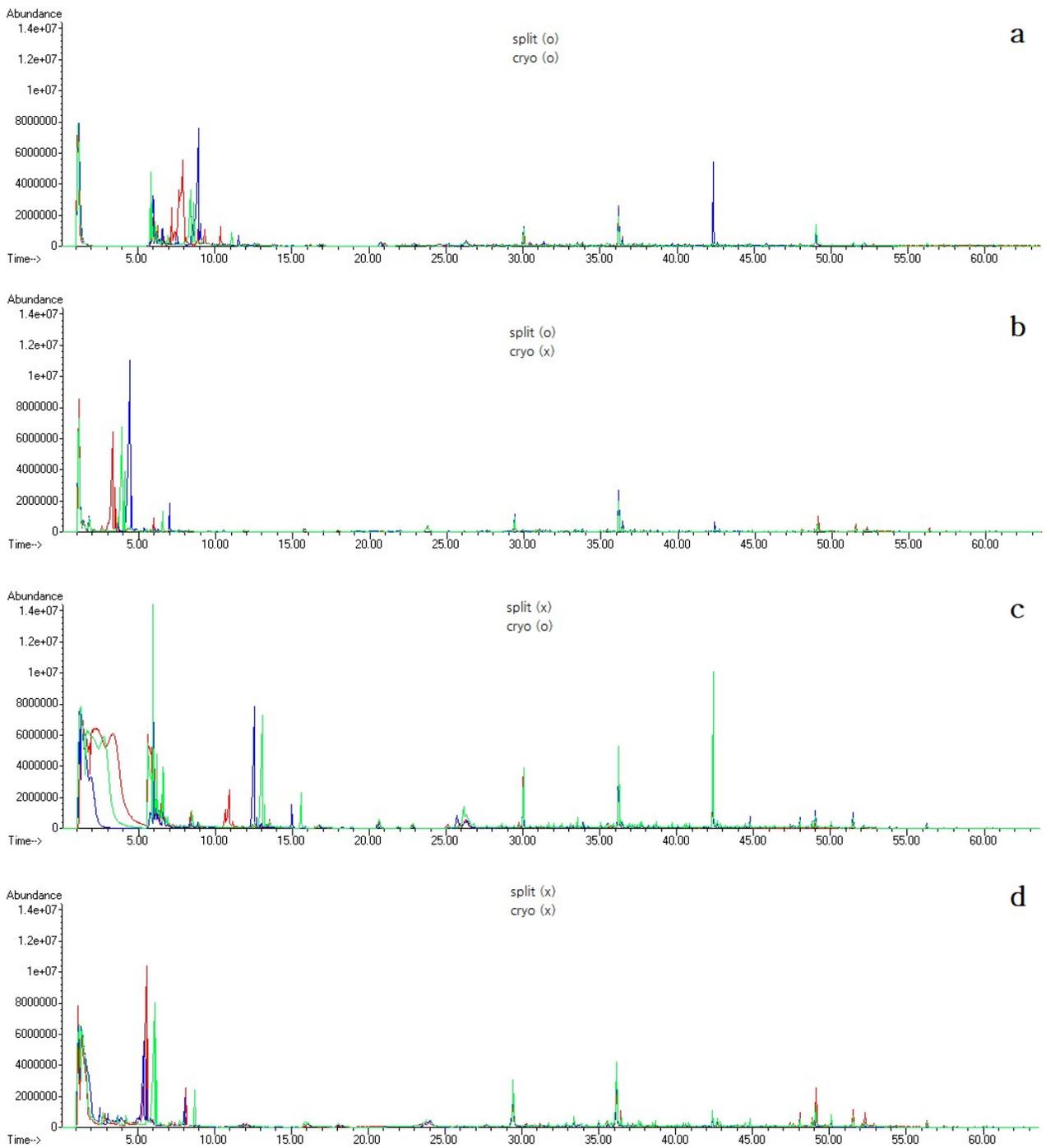


그림 31. split mode와 cryo-focusing 조건을 달리한 참깨 시료의 휘발성분 total ions chromatograms.

a : split 10:1, cryo-focusing -80°C , 5분, b : split 10:1,
 c : splitless, cryo-focusing -80°C , 5분, d : splitless

(다) 볶은 참깨의 휘발성 대사체 추출 및 분석

① 시료 준비

- 참깨의 휘발성 대사체 분석을 위해 농산물품질관리원으로부터 2018년에 생산된 국내산 27종을 얻었고, 중국 현지에서 중국산 6종, 추가로 수입산 6종을 구입하여 사용하였다.
- 국내산 27개, 수입산 12개 지역 (표 19)
- 휘발성 대사체 분석을 위한 시료의 목록은 위의 표 19과 같다.
- QC 시료로는 2018년에 전라남도 해남군 화원면에서 생산된 참깨를 사용하였다. 일간 SPME 방법의 재현성 확보를 위해 시료 4개마다 QC 시료를 1개씩 분석하여 오차를 보정하였다.
- 분석에 사용된 모든 시료는 보관, roasting, 추출 등의 전처리 과정 중의 수분으로 인한 실험 오차를 줄이기 위해 50°C의 dry oven에서 24시간 동안 건조하여 수분함량 2.5% 미만으로 조절한 후 사용되었다.

② SPME 추출

볶은 참깨의 휘발성 대사체의 SPME를 이용한 추출방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME용 20 mL vial에 참깨 시료 4.0g을 넣어 crimp cap으로 밀봉하였다. GC/MS에 부착된 MPS에서 180°C로 10분간 roasting하였으며, 재현성을 높이기 위해 vial 6개씩 한 세트로 진행하였다. (QC 시료는 예외로 vial 1개씩 한 세트로 진행하였다.)
- 180°C에서 roasting한 시료는 $1 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 냉장고에서 15분간 냉각시킨 후 10 μL syringe를 사용하여 내부표준물질 각 100 mg/L 2종을 6 μL 씩 첨가하였다.
- 내부표준물질로는 ethyl 2-methyl butyrate (CAS 7452-79-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, M.O., USA)과 methyl salicylate (CAS 119-36-8, Sigma-Aldrich)이 사용되었으며, 용매는 methanol을 사용하였다.
- vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 DVB/CAR/PDMS SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20 mL vial을 65°C에서 250 rpm으로 10분간 agitating하며 평형을 이룬 뒤 휘발성 성분을 30분간 흡착, 230°C에서 5분간 탈착하였다.

③ GC-MS를 이용한 휘발성 성분분석

- SPME법을 이용하여 추출 시료의 휘발성 대사체 성분은 7890B GC system과 5977A MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 HP-5MS (length 30m \times inner diameter 0.250mm \times film thickness 0.25 μm , Agilent Technologies)를 사용하였다. Oven은 40°C에서 3분간 유지하고, 280°C까지 4°C/min으로 온도를 높여 63분간 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, splitless mode로 설정하였다. mass spectra는 ionization energy는 70 eV로, mass scan range 35~350는 a.m.u.로 하였고, mass scan rate은 4.5 scan/sec으로 설정하였다.

표 19. 휘발성 대사체 분석에 사용한 참깨 시료 (국내산, 수입산)

	Nation	Province	Location	Labeling
국 내 산	대한민국	강원	인제	GWIJ
			춘천	GWCC
		경기	강화	GGGH
			고양	GGGY
			김포	GGGP
			양평	GGYP
			이천	GGIC
			파주	GGPJ
			경남	목포
		진주	GNJJ	
		창원	GNCW	
		경북	안동	GBAD
			영주	GBYJ
			칠곡	GBCG
		전남	광주	JNGJ
			무안	JNMA
			여수	JNYS
		전북	완주	JBWJ
			익산	JBIS
		제주	전주	JBJJ
			제주	JJJJ
		충남	공주	CNGJ
			대전	CNDJ
			서천	CNSC
		충북	괴산	CBGS
			청주	CBCJ
			충주	CBCH
수 입 산	중국1	흑룡강성	하얼빈	CHHR
		기림성	통화	CHGL
		하남성	주마덴	CHHN
		안후이성	화이난	CHAH
		광서장족자치구	류저우	CHGS
		운남성	바오산	CHYN
		중국2		OCHIN
수 입 산	나이지리아1		ONIGE	
	나이지리아2		CNIGE	
	인도		OINDI	
	에티오피아		DETHI	
	파키스탄		OPAKI	

④ 휘발성분의 정성 및 통계 분석

- SPME법으로 추출한 참깨의 휘발성 대사체는 non-targeted analysis 되었으며, mass profiler professional software (MPP, Agilent Technologies)가 사용되었다. hexane에 희석한 saturated alkanes C₇~C₃₀ (1 mg/mL in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI를 구한 후 문헌상의 RI값과 비교하였다. 분석된 모든 휘발성 대사체는 내부표준물질인 ethyl 2-methyl butyrate (100 mg/L)와 methyl salicylate (100 mg/L)를 기준으로 Retention Time (RT)값이 보정되었다.
- MS-DIAL에서 추출한 데이터로 SIMCA P+ software 에서 다변량 통계분석을 실시하여 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)를 이용한 시료 간의 차이를 확인하였다 (그림 32, 33).

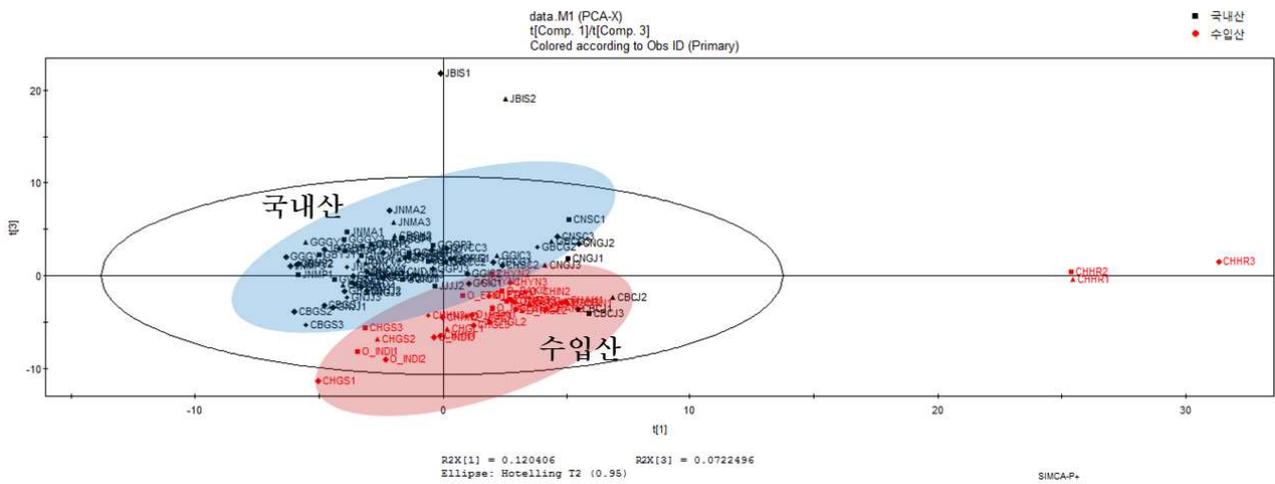


그림 32. 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체의 PCA score plot.

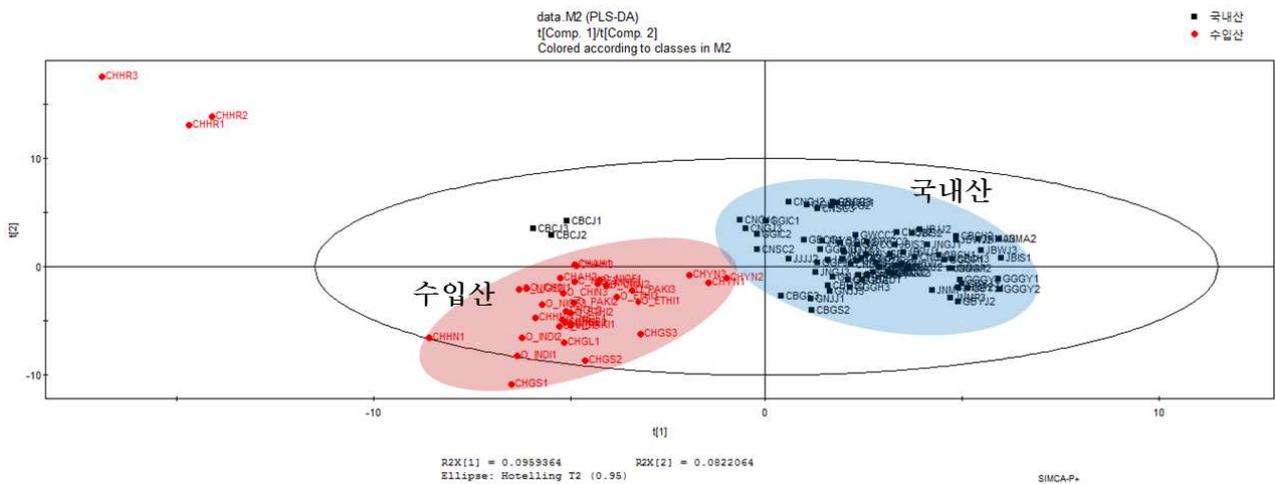


그림 33. 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot.

- 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체로 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)을 수행한 결과 두 그룹의 PCA component 1은 12.04%, PCA component 3은 7.22%의 설명력을 나타내어 총 19.26%으로 설명되었고 (그림 32), PLS-DA component1은 9.59%, PLS-DA component 2는 8.22%의 설명력을 나타내어 총 17.81%로 설명되었다 (그림 33). 국내산 참깨는 PLS component 1의 기준으로 양의 방향에 위치하고 있으며, 수입산 참깨는 PLS component 1의 기준으로 음의 방향, PLS component 2의 기준으로 음의 방향에 위치하였다. 국내산 참깨와 수입산 참깨는 PLS component 1을 기준으로 서로 차이를 보인다. 시료 수집 국가에 따라 각 시료 간 분포도 차이를 보임을 확인할 수 있다. 예외적으로 국내산 시료 중 CBCJ 1,2,3 (충청북도 청주)이 국내산 임에도 불구하고 수입산 시료와 유사하게 분류되었고, 수입산 시료 중 CHHR 1,2,3 (중국 흑룡강성 하얼빈)이 수입산 중에서도 다른 양상을 보였다. 이것은 시료의 독특한 품종 특성 등에서 기인한 것으로 생각된다.
- PLS-DA 분석을 통해 VIP list를 얻어 PLS component 1과 PLS component 2의 구분에 영향을 미치는 주요 peak를 추출하여 RI를 계산한 후 이를 문헌상의 RI와 비교하여 주요 성분을 분석하였다 (표 20, 21). VIP가 1.0이상인 휘발성 대사체만 선정해 분석하였다. PLS-DA component 1에 대한 VIP로는 alcohol류 1개, aldehyde류 7개, ester류 1개, hydrocarbons 3개, ketone류 2개, fatty acid 1개, phenol류 1개의 성분이 동정되었고, PLS-DA component 2에 대한 VIP로는 alcohol류 1개, aldehyde류 8개, ester류 1개, hydrocarbons 3개, ketone류 2개, fatty acid 1개, furan 계열 1개, phenol류 1개의 성분이 동정되었다. 이들 중 p-value 1.0이상인 것들을 PLS component 1의 양의 방향과 음의 방향으로 영향을 미치는 주요인자로 선정하였다. PLS component 1의 양의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 heneicosane, docasane, 2-heptadecanone, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one, furfural 등 이었고, PLS component 2의 음의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 hexanal, 2-pentylfuran 등 이었다. PLS component 2의 양의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 octanal, 1-octanal, 2-pentylfuran, decanal, benzeneacetaldehyde, hexanal, nonanal 등 이었고, PLS component 2의 음의 방향에 영향을 미치는 주요 성분은 docasane, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one, furfural 등 이었다 (그림 34, 35)
- 위의 분석 결과로 보아 참깨의 원산지 판별에는 alcohol류인 1-octanol, aldehyde류인 furfural, hexanal, octanal, decanal, benzeneacetaldehyde, nonanal, furan류인 2-pentylfuran, hydrocarbon류인 heneicosane, docasane, ketone류인 2-heptadecanone, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one 등이 높은 기여도를 가지는 것으로 나타났다.

표 20. 참깨 휘발성 대사체 PLS-DA component 1의 VIP list (>1.0)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
1	2199	2200	docosane	000629-97-0	2.46	MS/RI
2	-	-	unknown	-	2.46	MS
3	2300	2300	tricosane	000638-67-5	2.34	MS/RI
4	-	-	unknown	-	2.27	MS
5	1897	1897 ¹⁾	heptadecan-2-one	002922-51-2	2.10	MS/RI
6	-	-	unknown	-	2.05	MS
7	1029	1029 ²⁾	2-ethylhexan-1-ol	000104-76-7	1.83	MS/RI
8	1361	1363 ³⁾	(E)-undec-2-enal	002463-77-6	1.80	MS/RI
9	1962	1962 ⁴⁾	hexadecanoic acid	000057-10-3	1.70	MS/RI
10	1593	1588 ⁵⁾	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	006846-50-0	1.66	MS/RI
11	1260	1260 ⁶⁾	(E)-dec-2-enal	003913-81-3	1.66	MS/RI
12	800	800 ⁷⁾	hexanal	000066-25-1	1.62	MS/RI
13	831	831 ⁸⁾	furan-2-carbaldehyde	000098-01-1	1.62	MS/RI
14	2102	2100	hencosane	000629-94-7	1.60	MS/RI
15	1508	1508 ⁹⁾	2,6-ditert-butyl-4-methylphenol	000128-37-0	1.58	MS/RI
16	1840	1843 ¹⁰⁾	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	000502-69-2	1.51	MS/RI
17	1105	1105 ¹¹⁾	nonanal	000124-19-6	1.30	MS/RI
18	-	-	unknown	-	1.29	MS
19	-	-	unknown	-	1.26	MS
20	1044	1044 ¹²⁾	2-phenylacetaldehyde	000122-78-1	1.17	MS/RI
21	-	-	unknown	-	1.13	MS
22	-	649 ¹³⁾	3-methylbutanal	000590-86-3	1.12	MS/RI
23	-	-	unknown	-	1.02	MS

- 1) Ansorena, D.; Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J., Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage : chorizo de Pamplona, *Food Res. Int.*, 2001, 34, 1, 67-75.
- 2) Cho, I.H.; Namgung, H.-J.; Choi, H.-K.; Kim, Y.-S., Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.), *Food Chem.*, 2008, 106, 1, 71-76.
- 3) Sampaio, T.S.; Nogueira, P.C.L., Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity, *Food Chem.*, 2006, 95, 4, 606-610
- 4) Lalel, H.J.D.; Singh, Z.; Chye Tan, S., Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity, *Postharvest Biol. Technol.*, 2003, 29, 2, 205-218
- 5) Andriamaharavo, N.R., Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center., NIST Mass Spectrometry Data Center, 2014.
- 6) Kukic J.; Petrovic S.; Pavlovic M.; Couladis M.; Tzakou O.; Niketic M., Composition of essential oil of *Stachys alpina* L. ssp *dinarica* Murb., *Flavour Fragr. J.*, 2006, 21, 3, 539-542.
- 7) Juliani, H.R.; Zygadlo, J.A.; Scrivanti, R.; de la Sota, E.; Simon, J.E., The essential oil of *Anemia tomentosa* (Savigny) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel, *Flavour Fragr. J.*, 2004, 19, 6, 541-543

표 21. 참깨 휘발성 대사체 PLS-DA component 2의 VIP list (>1.0)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
1	-	-	unknown	-	2.34	MS
2	2199	2200	docosane	000629-97-0	2.31	MS/RI
3	2300	2300	tricosane	000638-67-5	2.18	MS/RI
4	-	-	unknown	-	2.15	MS
5	1897	1897 ¹⁾	heptadecan-2-one	002922-51-2	1.94	MS/RI
6	-	-	unknown	-	1.92	MS
7	1029	1029 ²⁾	2-ethylhexan-1-ol	000104-76-7	1.82	MS/RI
8	1361	1363 ³⁾	(E)-undec-2-enal	002463-77-6	1.79	MS/RI
9	1260	1260 ⁶⁾	(E)-dec-2-enal	003913-81-3	1.70	MS/RI
10	1593	1588 ⁵⁾	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	006846-50-0	1.68	MS/RI
11	1962	1962 ⁴⁾	hexadecanoic acid	000057-10-3	1.61	MS/RI
12	800	800 ⁷⁾	hexanal	000066-25-1	1.61	MS/RI
13	831	831 ⁸⁾	furan-2-carbaldehyde	000098-01-1	1.57	MS/RI
14	1840	1843 ¹⁰⁾	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	000502-69-2	1.52	MS/RI
15	1508	1508 ⁹⁾	2,6-ditert-butyl-4-methylphenol	000128-37-0	1.51	MS/RI
16	2102	2100	hencosane	000629-94-7	1.47	MS/RI
17	1044	1044 ¹²⁾	2-phenylacetaldehyde	000122-78-1	1.26	MS/RI
18	1105	1105 ¹¹⁾	nonanal	000124-19-6	1.20	MS/RI
19	-	-	unknown	-	1.20	MS
20	-	-	unknown	-	1.19	MS
21	-	-	3-methylbutanal	000590-86-3	1.17	MS
22	1003	1003 ¹⁴⁾	octanal	000124-13-0	1.16	MS/RI
23	992	992 ¹⁵⁾	2-pentylfuran	003777-69-3	1.15	MS/RI
24	2102	2100	hencosane	000629-94-7	1.12	MS/RI
25	-	-	unknown	-	1.11	MS
26	-	-	unknown	-	1.03	MS
27	-	-	unknown	-	1.03	MS

- 8) Tigrine-Kordiani, N.; Meklati, B.Y.; Chemat, F., Abalysis by gas chromatography - mass spectrometry of the essential oil of *Zygodphyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria, *Int. J. Aromatherapy*, 2006, 16, 3-4, 187-191.,
- 9) Moon, S.-Y.; Cliff, M.A.; Li-Chan, E.C.Y., Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry and -olfactometry, *Food Res. Int.*, 2006, 39, 3, 294-308
- 10) Radulovic, N.; Dordevic, N.; Markovic, M.; Palic, R., Volatile constituents of *Glechoma Hirsuta* Waldst. Kit. and G. *Hederacea* L. (Lamiaceae), *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2010, 24, 1, 67-76
- 11) Alissandrakis E.; Tarantilis P.A.; Harizanis P.C.; Polissiou M., Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 20, 8152-8157
- 12) Cioni, P.L.; Flamini, G.; Caponi, C.; Ceccarini, L.; Morelli, I., Analysis of volatile fraction, fixed oil and tegumental waxes of the seeds of two different cultivars of *Helianthus annuus*, *Food Chem.*, 2005, 90, 4, 713-717
- 13) Jarunrattanasri, A.; Theerakulkait, C.; Cadwallader, K.R., Aroma Components of Acid-Hydrolyzed Vegetable Protein Made by Partial Hydrolysis of Rice Bran Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 8, 3044-3050
- 14) Radulovic, N.; Dordevic, N.; Markovic, M.; Palic, R., Volatile constituents of *Glechoma Hirsuta* Waldst. Kit. and G. *Hederacea* L. (Lamiaceae), *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2010, 24, 1, 67-76.
- 15) Pino, J.A.; Mesa, J.; Muñoz, Y.; Martí, M.P.; Marbot, R., Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 6, 2213-2223

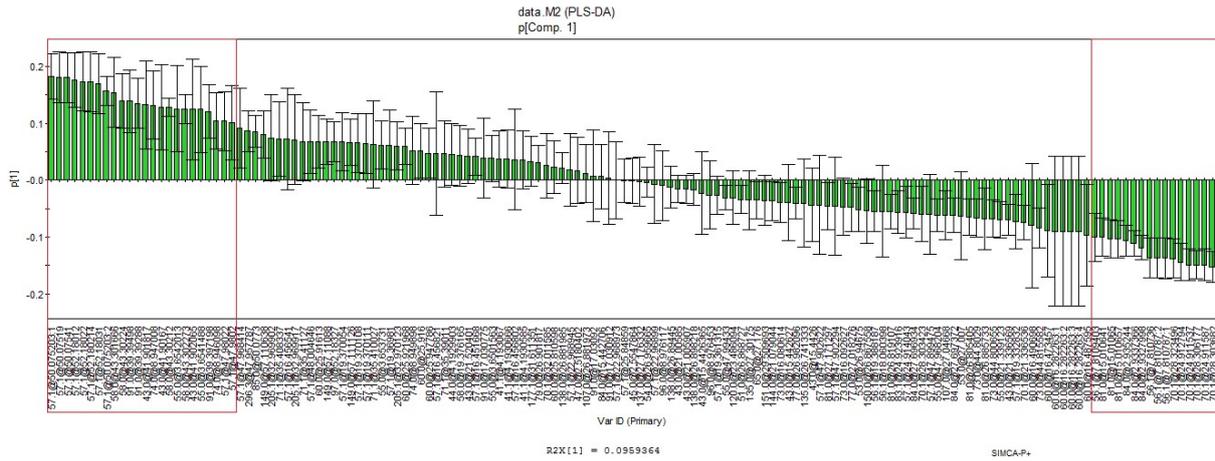


그림 34. 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체의 component 1의 VIP >1.0 인 성분 에 대한 loading plot.

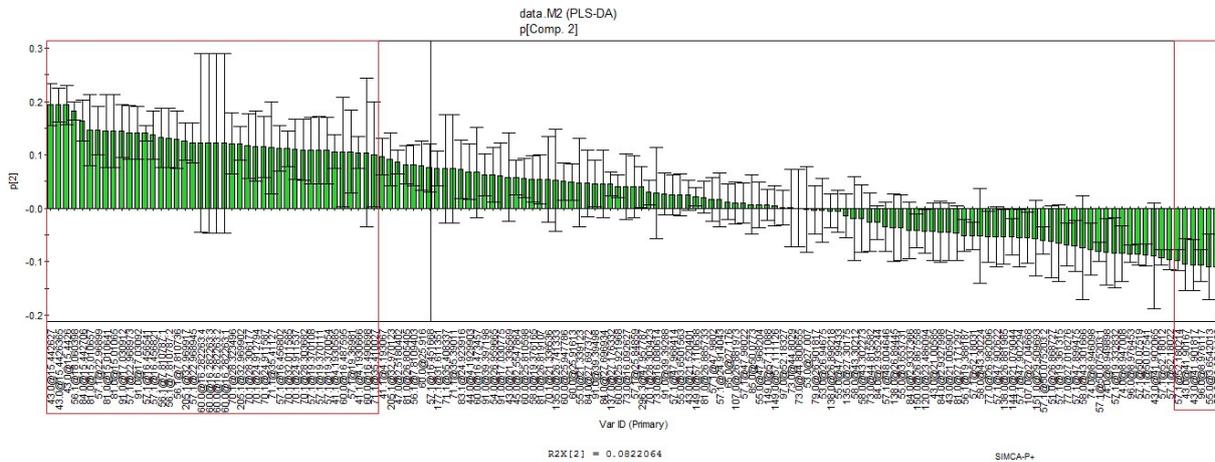


그림 35. 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체의 component 2의 VIP >1.0 인 성분 에 대한 loading plot.

- 더욱 정확한 결과값을 얻기 위해 국내산, 중국산 참깨의 분석결과에서 시료 간 근사치를 제외하고 차이가 두드러진 peaks만으로 PCA 분석과 함께 검증작업을 수행하였다 (그림 36, 37, 38). 국내산 참깨 training set으로는 전체시료 39종 중 26종의 국내산 참깨의 휘발성 대사체 분석결과를 설정하였고, 수입산 참깨 training set으로는 11종의 수입산 참깨의 휘발성 대사체 분석결과를 설정하였다. 국내산과 수입산에서 각 1개 지역씩 무작위로 선정한 2개 지역 참깨의 휘발성 대사체 분석결과를 unknown의 test set로 하여 PCA 분석을 수행한 결과 PCA component 1은 21.3%, PCA component 2는 8.36%, PCA component 3는 6.04%, 총 35.7%로 설명력이 상승하였다. HCA 분석을 수행한 결과 역시 (a) 수입산, (b) 국내산으로 적절하게 분리되었다 (그림 37, 38). 검증 시료로 사용된 (ㄱ) CHAH 1,2,3 (중국 안후이성 화이난)과 (ㄴ) JNMP 1,2,3 (한국 전라남도 목포)은 각자 수입산 그룹과 국내산 그룹에 위치하여 적절하게 분리되었으나 참깨의 휘발성 대사체를 분석한 전체 데이터로 수행한 PLS-DA 결과와 유사하게 국내산 시료 중 CBCJ 1,2,3 (한국 충청북도 청주)이 국내산 임에도 불구하고 수입산 시료와 유사도가 높은 것으로 분류되었고, 수입산인 (ㄷ) CHYN 1,2,3 (중국 운남성 바오산)이 예외적으로 국내산과 유사하게 분류되었다.

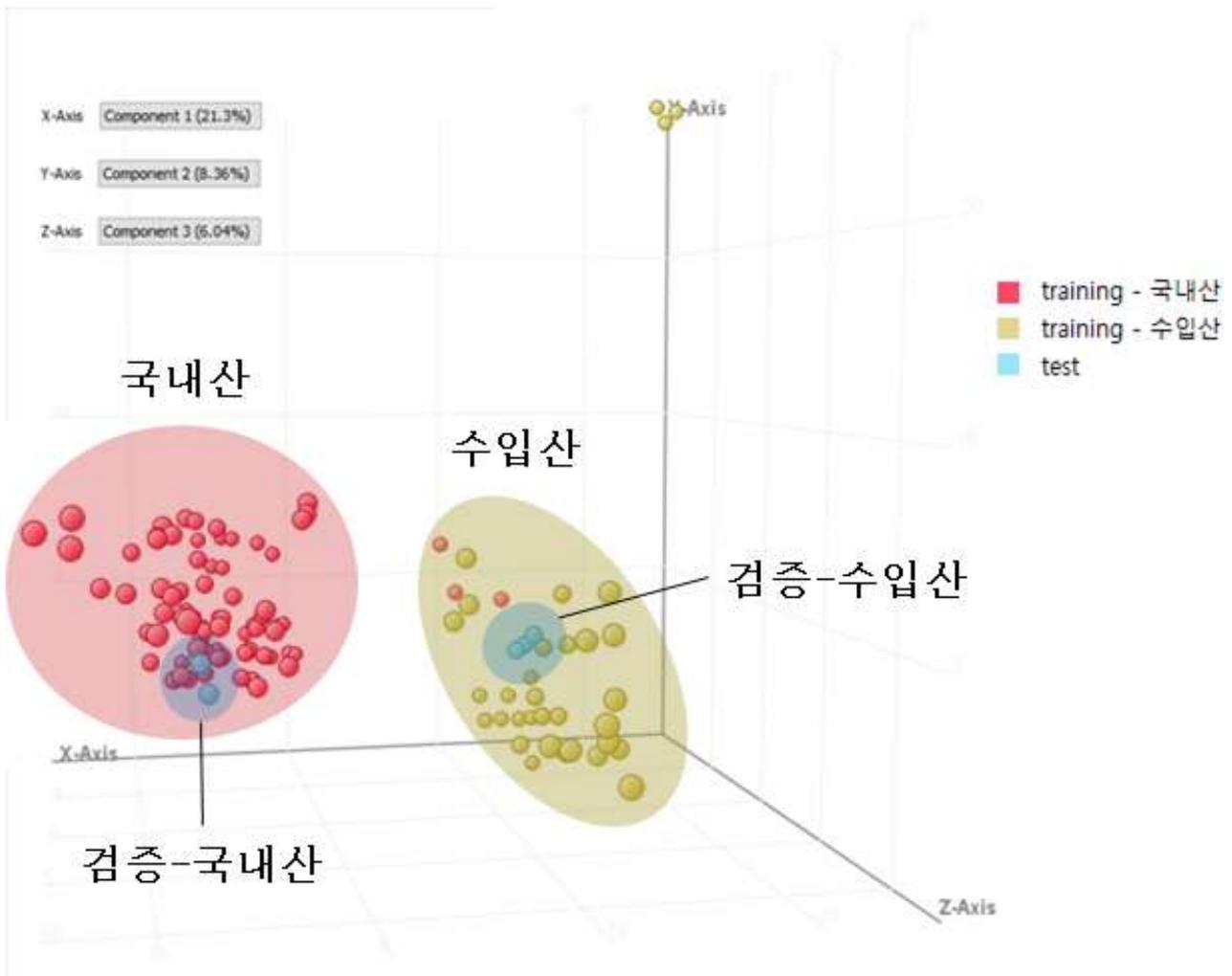


그림 36. 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체 중 주요인자로 training한 후 test set으로 검증한 PCA score plot.

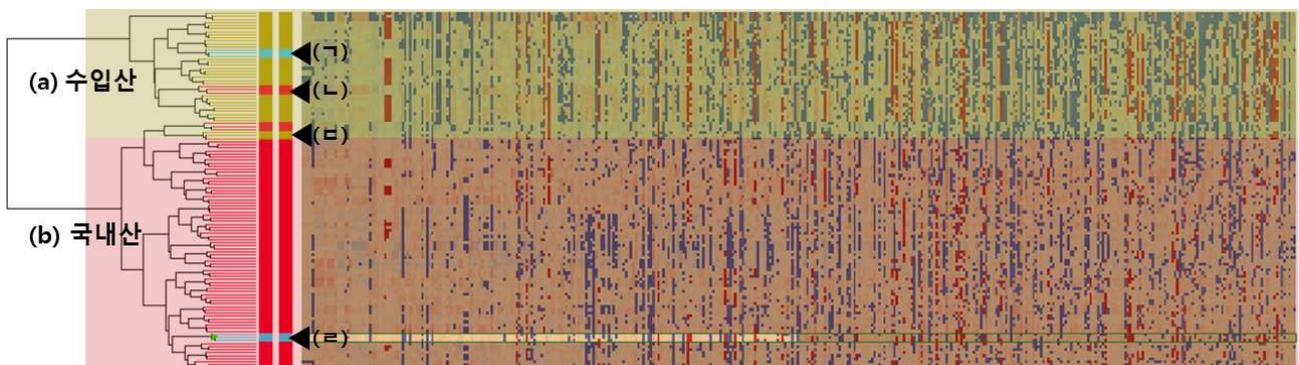


그림 37. 주요인자로 clustering한 참깨 시료의 hierarchical cluster analysis (HCA).
 (a) 수입산 참깨, (b) 국내산 참깨, (ㄱ) 검증시료 : 수입산 CHAH, (ㄴ) 국내산 GGGH,
 (ㄷ) 수입산 CHYN, (ㄹ) 검증시료 : 국내산 JNMP

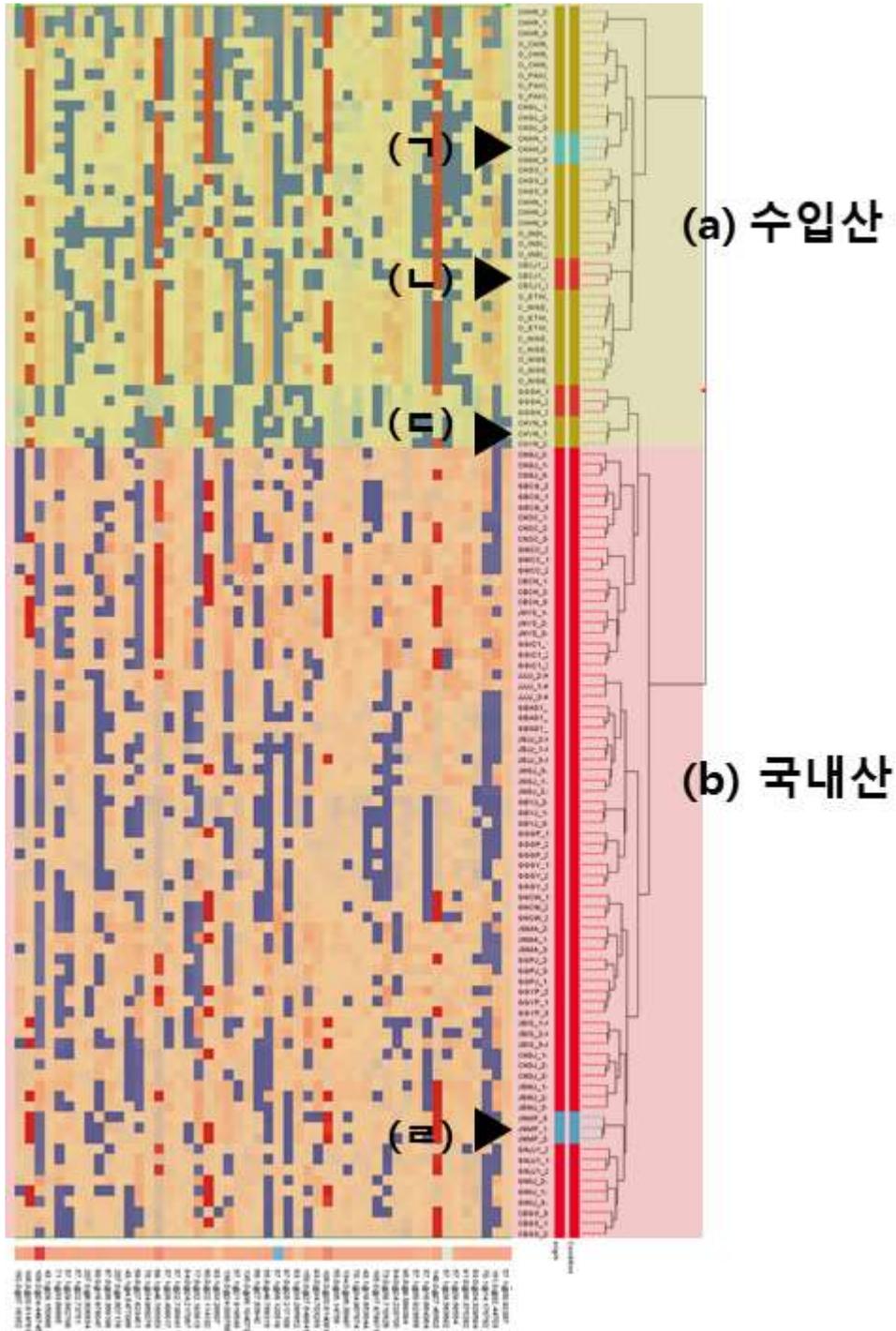


그림 38. 주요인자로 clustering한 참깨 시료의 hierarchical cluster analysis (HCA).



그림 39. 중국산 참깨시료.

(라) 생 참깨의 휘발성 대사체 추출 및 분석

① 시료 준비

- 참깨의 휘발성 대사체 분석을 위해 농산물품질관리원으로부터 2018년에 생산된 국내산 27종을 얻었고, 중국 현지에서 중국산 6종, 추가로 수입산 6종을 구입하여 사용하였다.
 - 국내산 27개, 수입산 12개 지역 (표 19)
- 휘발성 대사체 분석을 위한 시료의 목록은 위의 표 19과 같다.
- QC 시료로는 2018년에 전라남도 해남군 화원면에서 생산된 참깨를 사용하였다. 일간 SPME 방법의 재현성 확보를 위해 시료 4개마다 QC 시료를 1개씩 분석하여 오차를 보정하였다.
- 분석에 사용된 모든 시료는 보관, roasting, 추출 등의 전처리 과정 중의 수분으로 인한 실험 오차를 줄이기 위해 50°C의 dry oven에서 24시간 동안 건조하여 수분함량 2.5% 미만으로 조절한 후 사용되었다.

② SPME 추출

생 참깨의 휘발성 대사체의 SPME를 이용한 추출방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME용 20 mL vial에 참깨 시료 4.0g을 넣어 crimp cap으로 밀봉하였다. 재현성을 높이기 위해 vial 6개씩 한 세트로 진행하였다. (QC 시료는 예외로 vial 1개씩 한 세트로 진행하였다.)
- 내부표준물질로는 ethyl 2-methyl butyrate (CAS 7452-79-1, Sigma-Aldrich)과 methyl salicylate (CAS 119-36-8, Sigma-Aldrich)이 사용되었으며, 용매는 methanol을 사용하였다.
- vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 DVB/CAR/PDMS SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20 mL vial을 40°C에서 250 rpm으로 10분간 agitating하며 평형을 이룬 뒤 휘발성 성분을 30분간 흡착, 230°C에서 5분간 탈착하였다.

③ GC-MS를 이용한 휘발성 성분분석

- SPME법을 이용하여 추출 시료의 휘발성 대사체 성분은 7890B GC system과 5977A MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 HP-5MS (length 30m × inner diameter 0.250mm × film thickness 0.25 μm, Agilent Technologies)를 사용하였다. Oven은 40°C에서 3분간 유지하고, 280°C까지 4°C/min으로 온도를 높여 63분간 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, splitless mode로 설정하였다. mass spectra는 ionization energy는 70 eV로, mass scan range 35~350는 a.m.u.로 하였고, mass scan rate은 4.5 scan/sec으로 설정하였다.

④ 휘발성분의 정성 및 통계분석

- SPME법으로 추출한 참깨의 휘발성 대사체는 non-targeted analysis 되었으며, XCMS software (online version 2.00.00, the Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, USA) 가

사용되었다. hexane에 희석한 saturated alkanes C₇~C₃₀ (1 mg/mL in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI를 구한 후 문헌상의 RI값과 비교하였다. 분석된 모든 휘발성 대사체는 내부표준물질인 ethyl 2-methyl butyrate (100 mg/L)와 methyl salicylate (100 mg/L)를 기준으로 RT 값이 보정되었다.

- XCMS software에서 추출한 데이터로 SIMCA P+ software에서 다변량 통계분석을 실시하여 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)를 이용한 시료 간의 차이를 확인하였다 (그림 40, 41).

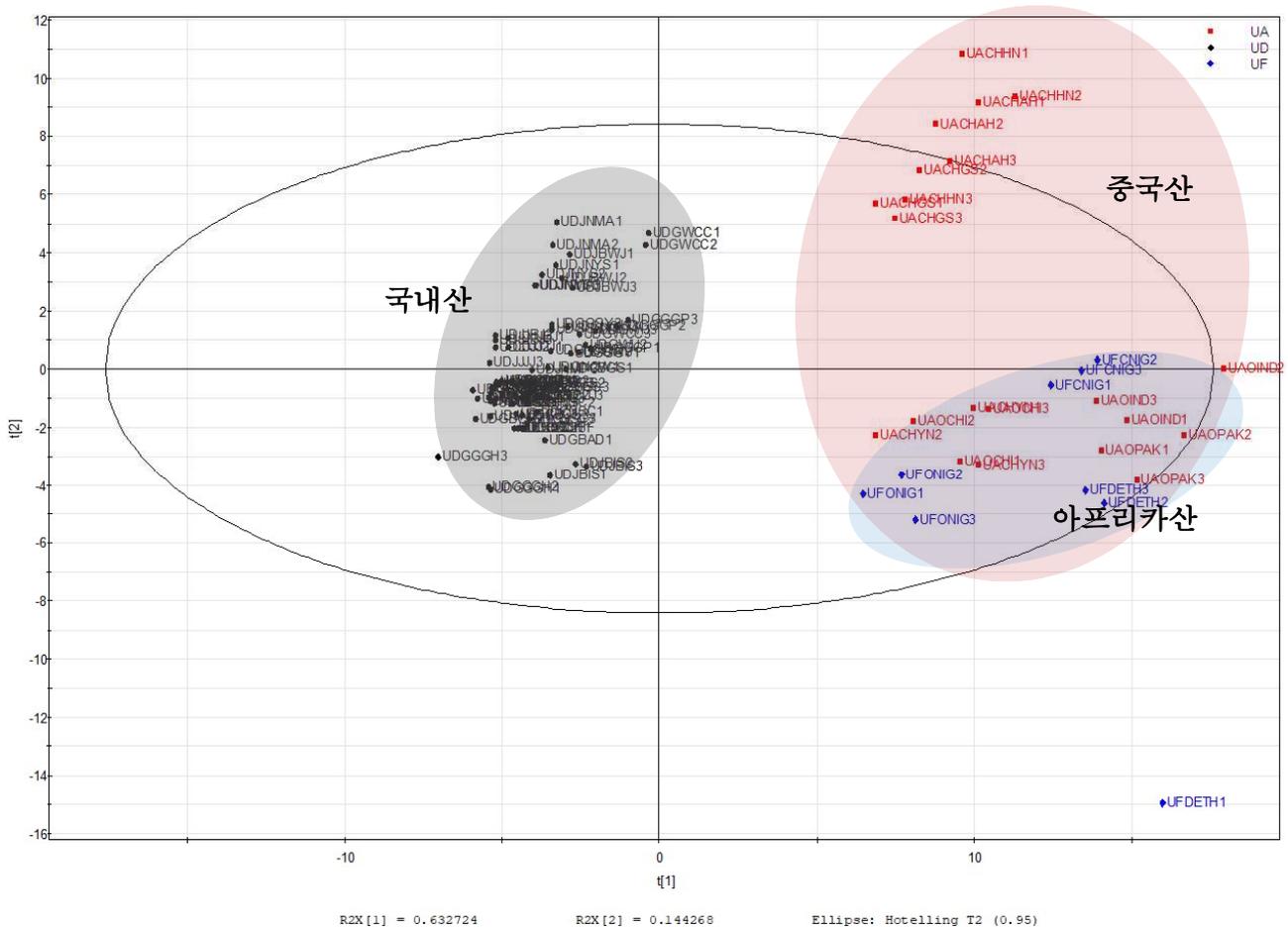


그림 40. 국내산, 수입산 (중국산, 아프리카산) 생참깨의 휘발성 대사체의 PCA score plot.

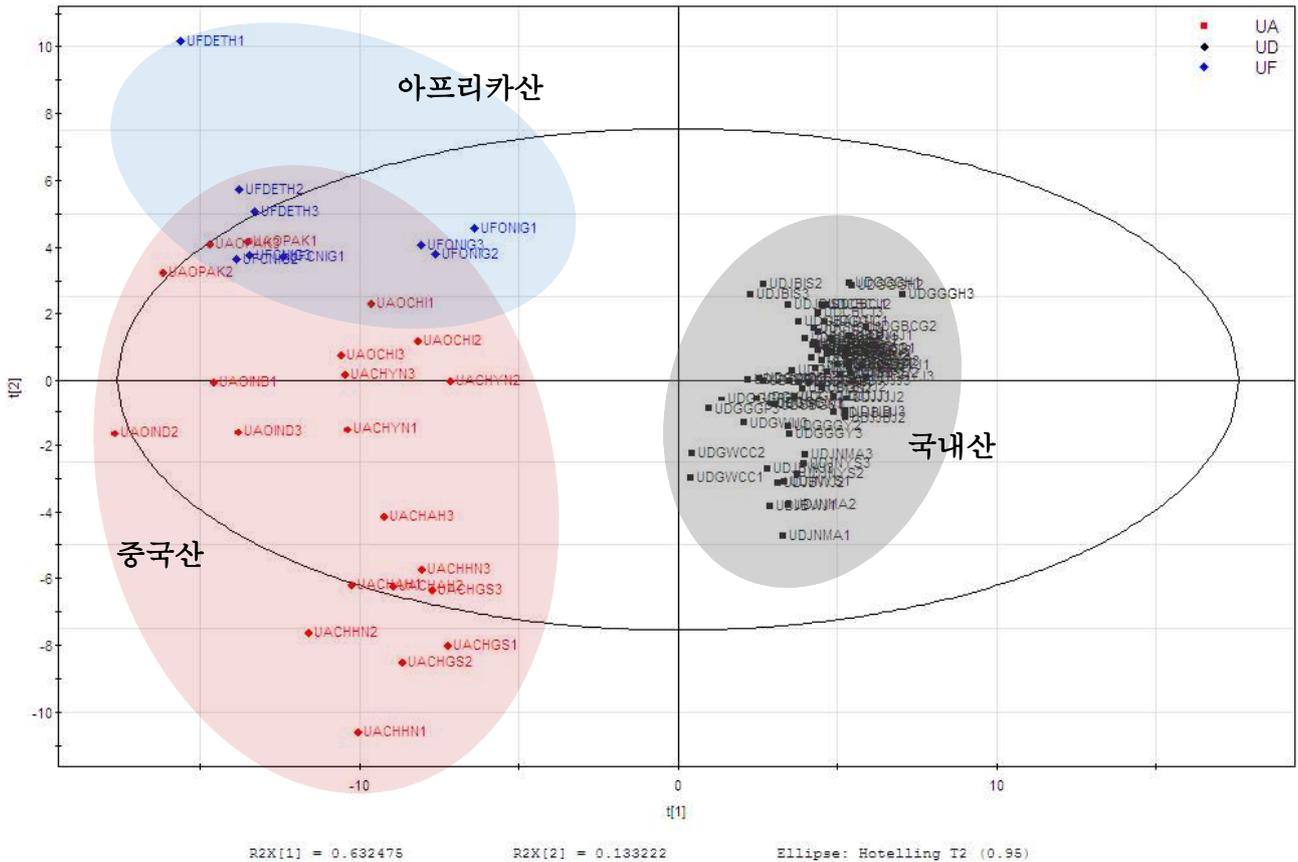


그림 41. 국내산, 수입산 (중국산, 아프리카산) 생참깨의 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot.

- 국내산, 수입산 참깨의 휘발성 대사체로 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)을 수행한 결과 두 그룹의 PCA component 1은 63.27%, PCA component 2은 14.43%의 설명력을 나타내어 총 77.77%으로 설명되었고 (그림 40), PLS-DA component1은 63.25%, PLS-DA component 2는 14.43%의 설명력을 나타내어 총 76.57%로 설명되었다 (그림 41). 국내산 참깨는 PLS component 1의 기준으로 양의 방향에 위치하고 있으며, 수입산 참깨는 PLS component 1의 기준으로 음의 방향에 위치하였다. 국내산 참깨와 수입산 참깨는 PLS component 1을 기준으로 서로 차이를 보인다.
- PLS-DA 분석을 통해 VIP list를 얻어 구분에 영향을 미치는 주요 peak를 추출하여 RI를 계산한 후 이를 문헌상의 RI와 비교하여 주요 성분을 분석하였다 (표 23). VIP가 1.0이상인 휘발성 대사체만 선정해 분석하였다. PLS-DA component 1에 대한 VIP로는 aldehyde류 1개, ester류 4개의 총 5개의 성분이 동정되었다. 이들 주요 성분은 methyl acetate, hexanal, methyl hexanoate, methyl heptanoate, methyl octanoate 이다. 이러한 methyl ester와 hexanal은 국내산과 수입산 구별에 기여하는 것으로 나타났다.

23. 생 참깨 휘발성 대사체 PLS-DA component1의 VIP list (>1.0)

	Tentative identification	CAS number	Entities	
			m/z	tR (min)
1	methyl acetate	79-20-9	43, 59, 74	3.04
2	hexanal	66-25-1	44	8.18
3	methyl hexanoate	106-70-7	41, 59, 71, 74, 75, 87, 99	12.85
4	methyl heptanoate	106-73-0	74	16.80
5	methyl octanoate	111-11-5	59, 74, 87, 127	20.63

(5) 원산지에 따른 대상 농산물 쌀의 대사체 지문 분석

(가) 쌀의 대사체 분석을 위한 전처리 조건에 따른 비교

- 쌀의 휘발성 대사체 분석 방법을 연구하기 위해 국내산 백미, 현미를 구입하여 예비실험을 진행하였다.



그림 42. 국내산 백미, 현미 시료

- 쌀의 휘발성 성분의 solid phase micro-extraction (SPME)를 이용한 추출 방법 및 GC/MS 분석결과를 기반으로 최적 조건을 설정하였다.
- 예비 실험 과정에서 screw cap의 septa가 고온으로 전처리시 부풀어 오르고, siloxane류의 성분이 다른 성분보다 abundance가 높아 crimp cap으로 교체하여 실험을 진행하였다.
- 3가지 전처리 방법 : raw rice, ground rice, cooked rice
- boiling condition : 50°C, 60°C, 80°C / 20분

① 3가지 전처리 방법

- 다양한 선행연구를 참조하여 총 3가지의 전처리 방법을 시행하였다.

㉠ Raw rice

아무 전처리를 하지 않은 시료로, 날 것 그대로를 이용하였다. 20mL crimp vial에 시료를 5g 넣고 crimp cap으로 막았다.

㉡ Ground rice

쌀 7g을 믹서기로 1분 동안 간 후, 20mL crimp vial에 5g을 넣고 crimp cap으로 막았다.

㉢ Cooked rice

쌀 5g과 3차 증류수 5ml을 20ml crimp vial에 넣고 crimp cap으로 막았다. 온도 제어의 재현성

을 높이기 위해 GC/MS에 부착된 MPS를 사용하여 100°C에서 20분간 boiling 하였다.

② SPME 추출

- 휘발성 성분분석을 위한 최적의 전처리 온도를 찾기 위해 각 50°C, 60°C, 80°C의 세 구간으로 나누어 20분간 boiling 하며 boiling 온도별 휘발성 대사체의 차이를 보았으며, 20mL crimp vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 CAR/PDMS/DVB SPME fiber (supelco)를 사용하였다. 또한 온도 제어의 재현성을 높이기 위해 GC/MS에 부착된 MPS를 사용하였다.
- 3가지 전처리 방법을 거친 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20mL screw vial을 250RPM, 60°C에서 20분간 유지시켜 평형을 이룬 뒤, 20분간 CAR/PDMS/DVB SPME fiber(supelco)를 사용하여 흡착하였다. 그리고 230°C에서 5분간 유지하며 휘발성 성분을 탈착시켰다.

③ SPME 및 GC/MS 분석 방법

- GC/MS 분석 방법
 - SPME법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기성분은 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent technologies)를 이용하여 분석하였다.
 - Column은 DB-5MS(30m length×0.25mm I.D.×0.25 μm film thickness, J&W Scientific)를 사용하였으며, Oven은 40°C에서 6분간 유지하였고, 130°C까지 5°C/min으로 온도를 높인 후 3분간 머무른 후, 250°C까지 6°C/min으로 온도를 높인 후 15분간 머물러 분석하였다.
 - 이동상 기체로는 helium을 0.8mL/min로 이용하였고, splitless모드로 설정하였다. 그리고 mass spectra ionization energy는 70eV였고, mass scan range는 35-350 a.m.u였다.

④ 휘발성분의 정성 및 정량

- SPME법으로 추출한 쌀의 휘발성 대사체는 mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다. 정량 결과는 각 peak의 area를 전체 peak area의 합으로 나눈 값 (%)을 사용하였다 (표 24, 25).
- Nonanal, 2-pentylfuran, hexanal, 1-octen-3-ol은 세가지 전처리 방법에서 모두 검출되었고, 그 중 nonanal과 hexanal은 다른 방법에 비해 ground rice에서 많이 검출되었고, 2-pentylfuran 과 1-octen-3-ol은 raw rice에서 많이 검출되었다. 또한 지방산 류는 ground rice에서 많이 검출되었다. 다른 방법에 비해 raw rice로 분석하였을 때, 가장 많은 휘발성 성분이 검출되었다 (표 24).
- 전처리 온도별 휘발성 대사체 성분을 비교하면, 50°C에서 검출되지 않았던 2-pentylfuran이 60°C와 80°C에서 검출되었다. 또한, acid류와 alcohol류 모두 80°C에서 많이 검출되었다. 그리고 ketone류는 60°C와 80°C에서 휘발성 성분의 수의 차이는 없었으나 60°C에 비해 80°C에서 휘발성 성분의 abundance가 더 크게 나타났다 (표 25). 이는 지방산화, 지방대사 산물이 80°C에서 많이 발생하는 것으로 사료된다. 80°C 전처리 과정에서 수증기가 생성되어 휘발성 추출에 영향을 미칠 수 있을 것이라고 사료된다. 또한 원산지 별 시료의 수분 함량에 따라 휘발성 성분 추출에 영향을 미칠수 있기 때문에 40°C의 dry oven에서 2시간동안 건조하여 수분함량을 10.5% 미만으로 조절하는 전처리 조건이 필요할 것으로 판단된다.

표 24. 전처리 방법 별 휘발성 대사체 비교

No.	CAS #	possible volatile compounds	peak area		
			Raw rice	Ground rice	Cooked rice
Alcohols					
1	000123-96-6	octan-2-ol	0.141±0.123	N.D.	N.D.
2	000111-27-3	hexan-1-ol	0.025±0.029	N.D.	N.D.
3	003391-86-4	oct-1-en-3-ol	3.957±1.518	3.474±3.012	2.337±1.778
4	002370-14-1	2,2-dimethyloctan-1-ol	1.187±1.028	0.318±0.551	0.645±0.256
5	054004-41-0	4-methyl-2-propylpentan-1-ol	0.422±0.143	N.D.	0.272±0.052
6	010042-59-8	2-propylheptan-1-ol	0.766±0.171	0.34±0.298	0.795±0.57
7	002370-14-1	2,2-dimethyloctan-1-ol	0.707±0.404	N.D.	N.D.
8	057289-26-6	(2S)-2-methyldodecan-1-ol	0.105±0.031	N.D.	0.024±0.042
9	002370-14-1	2,2-dimethyloctan-1-ol	0.092±0.029	0.053±0.092	0.233±0.113
10	018675-24-6	2-methyldecan-1-ol	N.D.	0.129±0.147	0.074±0.051
11	003761-94-2	1-methylcycloheptan-1-ol	0.02±0.018	0.263±0.23	0.063±0.019
12	921600-09-1	2-ethyl-2-methyltridecan-1-ol	0.07±0.037	0.723±0.42	0.393±0.22
13	000112-47-0	decane-1,10-diol	N.D.	0.161±0.212	0.069±0.043
14	000818-81-5	2-methyloctan-1-ol	N.D.	0.161±0.052	0.03±0.027
Aldehydes					
15	000590-86-3	3-methylbutanal	0.245±0.075	0.071±0.123	0.083±0.101
16	000096-17-3	2-methylbutanal	0.213±0.082	N.D.	0.065±0.112
17	000110-62-3	pentanal	0.238±0.25	0.491±0.426	0.306±0.269
18	000066-25-1	hexanal	8.787±2.877	16.966±11.481	12.521±5.452
19	000111-71-7	heptanal	0.668±0.376	0.677±0.591	0.43±0.355
20	000124-13-0	octanal	1.099±0.665	1.759±1.583	0.779±0.534
21	000124-19-6	nonanal	5.294±1.591	11.321±8.117	3.665±1.842
22	000112-31-2	decanal	0.969±0.294	N.D.	0.319±0.552
23	006728-26-3	(E)-hex-2-enal	N.D.	N.D.	0.055±0.049
24	000615-30-5	3-hydroxy-2-methylpentanal	0.006±0.01	0.237±0.208	0.167±0.049
25	002765-11-9	pentadecanal	N.D.	N.D.	0.132±0.025
26	000124-25-4	tetradecanal	0.053±0.012	0.25±0.246	N.D.
Acids					
27	000057-10-3	hexadecanoic acid	0.599±0.31	10.099±2.825	5.217±1.798

28	000544-63-8	tetradecanoic acid	0.069±0.006	0.433±0.184	0.308±0.092
29	000060-33-3	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	N.D.	0.495±0.196	0.181±0.063
30	000112-80-1	(Z)-octadec-9-enoic acid	0.039±0.035	2.019±1.017	0.8±0.295
Esters					
31	074367-34-3	(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	0.456±0.324	0.826±0.724	0.088±0.1
32	000112-39-0	methyl hexadecanoate	1.001±0.988	1.635±0.992	0.355±0.274
33	000112-62-9	methyl (Z)-octadec-9-enoate	0.089±0.056	0.225±0.124	0.068±0.045
34	013481-95-3	methyl (E)-octadec-10-enoate	0.056±0.055	0.23±0.073	0.089±0.043
Ketones					
35	000067-64-1	propan-2-one	0.723±0.165	N.D.	0.122±0.212
36	000107-87-9	pentan-2-one	0.011±0.02	N.D.	N.D.
37	000110-43-0	heptan-2-one	0.229±0.087	N.D.	0.097±0.039
38	000110-93-0	6-methylhept-5-en-2-one	1.106±0.565	N.D.	0.631±0.714
39	000585-25-1	octane-2,3-dione(CAS)	N.D.	0.8±0.787	N.D.
40	000589-63-9	octan-4-one	1.657±1.329	N.D.	N.D.
41	001629-60-3	hex-1-en-3-one	N.D.	N.D.	0.459±0.181
42	062831-62-3	4-propan-2-ylcyclohexane-1,3-dione	0.395±0.034	N.D.	0.16±0.118
43	000502-69-2	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	0.038±0.016	0.168±0.019	0.062±0.026
Benzenes					
45	000108-88-3	toluene	1.381±0.474	1.012±0.878	1.668±0.803
46	000095-47-6	1,2-xylene	0.09±0.067	N.D.	0.116±0.046
47	000108-38-3	1,3-xylene	0.111±0.039	N.D.	0.079±0.031
Furan					
48	003777-69-3	2-pentylfuran	5.468±1.262	2.524±2.011	4.247±1.144
Terpenes					
49	000080-56-8	α -pinene	0.04±0.035	0.311±0.322	0.02±0.034
50	013466-78-9	δ -3-Carene	N.D.	0.934±0.821	N.D.

표 25. 전처리 온도 별 휘발성 대사체 비교

No.	CAS #	possible volatile compounds	peak area		
			50°C	60°C	80°C
Alcohols					
1	000123-96-6	octan-2-ol	N.D.	N.D.	0.136
2	000111-27-3	hexan-1-ol	0.016	N.D.	0.124
3	003391-86-4	oct-1-en-3-ol	0.085	0.551	1.143
4		5-methyl-2-prop-1-en-2-ylcyclohexan-1-ol	N.D.	N.D.	0.046
5	000513-85-9	butane-2,3-diol	0.007	0.044	0.066
6	000111-32-0	4-methoxybutan-1-ol	N.D.	N.D.	0.106
7	000763-32-6	3-methylbut-3-en-1-ol	N.D.	N.D.	0.006
8	000123-51-3	3-methylbutan-1-ol	0.022	0.134	0.075
Aldehydes					
9	000123-72-8	butanal	0.001	N.D.	0.032
10	000590-86-3	3-methylbutanal	0.006	0.048	0.042
11	000096-17-3	2-methylbutanal	0.006	N.D.	N.D.
12	000066-25-1	hexanal	0.033	0.361	0.157
13	000111-71-7	heptanal	N.D.	0.073	0.335
14	000124-13-0	octanal	N.D.	N.D.	0.313
15	000112-31-2	decanal	N.D.	N.D.	0.153
16	056554-92-8	(E)-octadec-10-enal	N.D.	0.008	N.D.
Acids					
17	000064-19-7	acetic acid	N.D.	N.D.	0.024
18		oxalic acid, 2-ethylhexyl isohexyl ester	0.004	N.D.	N.D.
19		(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl)2-methylpropanoic acid	0.102	N.D.	0.290
20	000079-31-2	2-methylpropanoic acid	0.072	N.D.	N.D.
21	000503-74-2	3-methylbutanoic acid	N.D.	0.016	0.139
22	000116-53-0	2-methylbutanoic acid	N.D.	N.D.	0.054
23	000057-10-3	hexadecanoic acid	N.D.	N.D.	0.092
24	000060-33-3	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	N.D.	0.019	0.053
Ketones					
25	000067-64-1	propan-2-one	0.082	0.453	0.243
26	000107-87-9	pentan-2-one	N.D.	0.010	0.018
27	000110-43-0	heptan-2-one	N.D.	0.015	0.018
28	000589-63-9	octan-4-one	0.036	0.153	0.394
Furan					
29	003777-69-3	2-pentylfuran	0.048	0.752	N.D.

(나) 쌀의 대사체 분석을 위한 분석 방법 별 비교

쌀의 휘발성 성분의 GC/MS 분석법

- split mode : 10:1
- cryo-focusing : -80°C

① HS-SPME 추출

- 시료는 HS-SPME 방법으로 추출하였으며, 쌀의 휘발성 성분을 위한 최적의 추출 방법을 찾기 위해 split, splitless mode를 비교하였으며, cryo-trapping을 실시한 시료와 그렇지 않은 시료를 비교하였다.
- split mode 비교 실험에서는 10:1로 split을 준 그룹과 splitless 그룹을 비교하였으며, cryo-trapping을 비교한 실험에서는 액체질소를 사용하여 -80°C로 5분간 trapping한 그룹과 trapping을 거치지 않은 그룹을 비교하였고, 각 3번 반복하여 실험을 수행하였다.
- 시료는 2018년 국내에서 재배한 쌀을 구매하여 실험하였다.
- 20 mL screw vial에 쌀 시료 5.0g을 넣고 MPS를 사용하여 80°C에서 vial 1개씩 20분간 250 rpm으로 agitating하며 boiling하였다. CAR/PDMS/DVB SPME fiber를 사용하여 휘발성 성분을 추출하였다.

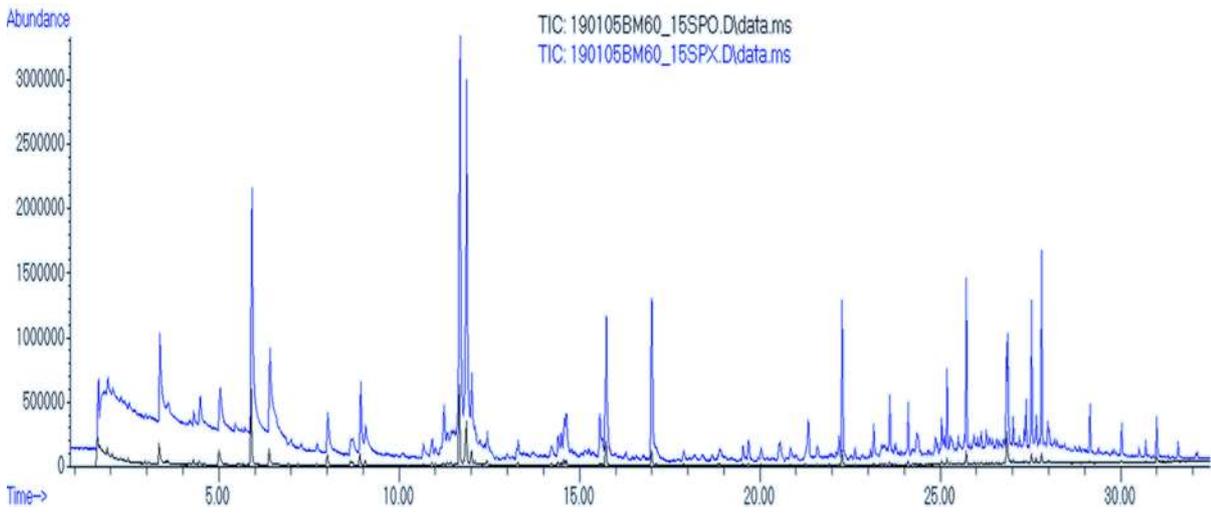
② GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

- HS-SPME 추출법으로 시료의 휘발성 대사체 성분을 추출하여 7890A GC system과 5975C MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-5MS (length 30m × inner diameter 0.250mm × film thickness 0.25 μm, Agilent Technologies)를 사용 하였다. Oven은 40°C에서 6분간 유지하였고, 130°C까지 5°C/min으로 온도를 높인 후 3분간 머무른 후, 250°C까지 6°C/min으로 온도를 높인 후 15분간 머물러 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, mass spectra는 ionization energy는 70eV로, mass scan range은 35~350 a.m.u.로 하였고, mass scan rate는 4.5 scan/sec으로 설정하여 얻었다.

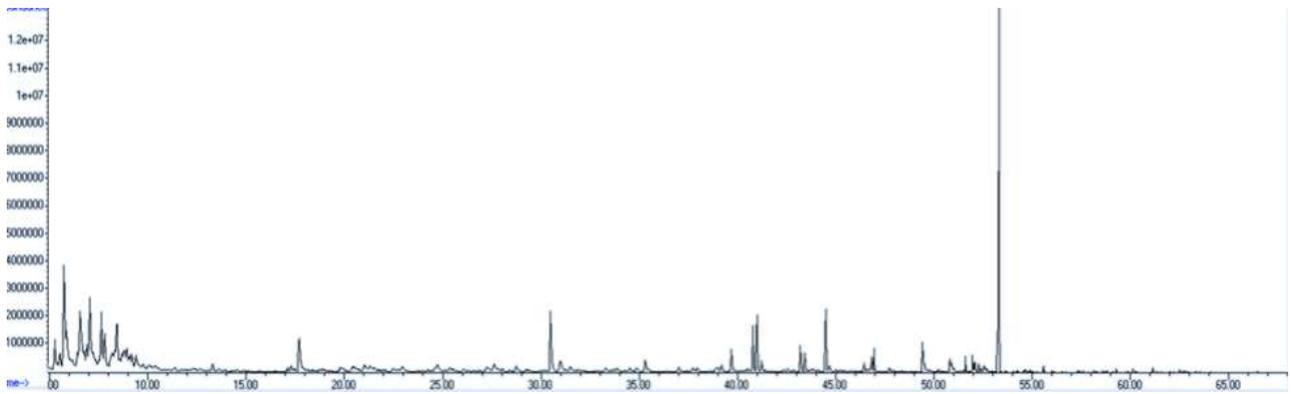
③ 휘발성 성분의 정성분석 및 분석조건 비교

- 쌀의 휘발성 성분의 비교분석은 targeted analysis로 진행되었으며, mass spectral database (W9N08.L) 및 manual interpretation으로 수행하였다.
- 시료의 휘발성 대사체 성분의 농도가 비교적 낮기 때문에 split mode로 분석한 데이터에 비해 splitless mode로 분석한 데이터에서 휘발성 대사체가 더 많이 검출 되었고, 액체질소를 사용하여 -80°C로 cryo-focusing을 한 경우에는 사용하지 않은 시료와 비교하여 peak abundance의 차이가 크지 않게 나타났다 (그림 43). 시료의 휘발성 대사체 성분의 농도가 비교적 낮고 cryo-trapping의 효과가 미비하기 때문에 주요 휘발성 성분이 높게 검출되는 splitless mode로 cryo-trapping없이 진행하는 것이 효과적일 것으로 사료된다 (그림 43).

(a)



(b)



(c)

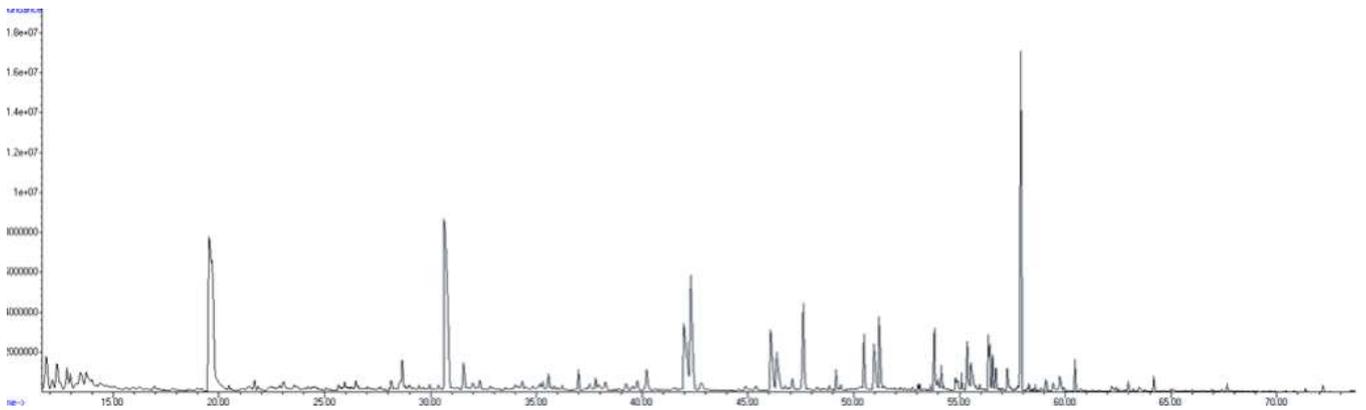


그림 43. split mode와 cryo-focusing 조건을 달리한 쌀 시료의 휘발성분 total ions chromatograms.

a : split 10:1 mode와 splitless mode overlay chromatogram

b : splitless mode chromatogram, c : splitless, cryo-focusing -80°C

(다) 백미의 휘발성 대사체 추출 및 분석

① 시료 준비

- 쌀의 휘발성 대사체 분석을 위해 농산물품질관리원으로부터 2018년에 생산된 국내산 16종을 얻었고, 중국 현지에서 중국산 5종을 추가로 사용하였다.
- 환경적 요인에 의한 쌀의 휘발성 대사체 분석을 위해 식량과학원으로부터 환경적 요인을 제외한 다른 조건이 동일하게 2018년에 생산된 국내산 14종을 얻었다.
 - 국내산 22개, 수입산 5개 지역 (표 26)
 - 식량과학원으로부터 얻은 모든 시료는 정미기 및 현미기 (SY88-TH, 쌍용기계산업(주), 인천, 한국)를 이용해 현미와 왕겨를 분리한 후, MC-90A기 (한국토요, 안성, 한국)를 이용해 12분 도미의 백미를 얻었다.
- 휘발성 대사체 분석을 위한 시료의 목록은 위의 표 26과 같다.
- QC 시료로는 2018년에 재배된 국내산 쌀을 사용하였다. 일간 SPME 방법의 재현성 확보를 위해 시료 4개마다 QC 시료를 1개씩 분석하여 오차를 보정하였다.
- 분석에 사용된 모든 시료는 보관, 추출 등의 전처리 과정 중의 수분으로 인한 실험오차를 줄이기 위해 40°C의 dry oven에서 2시간 동안 건조하여 수분함량 10.5% 미만으로 조절한 후 사용되었다.

② SPME 추출

백미의 휘발성 대사체의 SPME를 이용한 추출방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME용 20 mL vial에 쌀 시료 5.0g을 넣어 crimp cap으로 밀봉하였다. 재현성을 높이기 위해 vial 6개씩 한 세트로 진행하였다. (QC 시료는 예외로 vial 1개씩 한 세트로 진행하였다.)
- 내부표준물질로는 ethyl 4-methylvalerate (CAS 25415-67-2, Sigma-Aldrich)이 사용되었으며, 용매는 methanol을 사용하였다.
- vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 DVB/CAR/PDMS SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20 mL vial을 60°C에서 250 rpm으로 20분간 agitating하며 평형을 이룬 뒤 휘발성 성분을 20분간 흡착, 230°C에서 5분간 탈착하였다.

③ GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

- SPME법을 이용하여 추출 시료의 휘발성 대사체 성분은 7890B GC system과 5977A MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-5MS (length 30m × inner diameter 0.250mm × film thickness 0.25 μm, Agilent Technologies)를 사용 하였다. Oven은 40°C에서 3분간 유지하고, 80°C까지 2°C/min으로 온도를 높여 5분간 머무른 후, 200°C까지 3°C/min 속도로 높여 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, splitless mode로 설정하였다. mass spectra는 ionization energy는 70 eV로, mass scan range 35~350는 a.m.u.로 하였고, mass scan rate은 4.5 scan/sec으로 설정하였다.

표 26. 휘발성 대사체 분석에 사용한 백미시료

	Nation	Province	Location	Variety	Labeling		
농 산 물 품 질 관 리 원	대한민국	강원	양양	맛드림	GWHS		
			횡성	운광	GWYY		
		경기	파주	삼광	GGPJ		
			연천	대안	GGYC		
		경남	함안	새일미	KNHA		
			함안	영호진미	KNHN		
		경북	예천	일품	KBYC		
			경주	삼광	KBGJ		
		전남	강진	새일미	JNGJ		
			해남	신동진	JNHN		
		전북	김제	신동진	JBGJ		
			진안	새누리	JBJA		
		충남	아산	삼광	CNAS		
			서산	새일미	CNSS		
		충북	충주	삼광	CBUJ		
			청주	황금노들	CBCJ		
식 량 과 학 원	대한민국	경기	화성	일품	GGHSI		
			오대	GGHSO			
			수원	일품	GGSWI		
			오대	GGSWO			
		강원	철원	오대	GWCWO		
			춘천	일품	GWCCI		
				오대	GWCCO		
			충북	청주	일품	CBCJI	
		오대			CBCJO		
		전북	전주	일품	JBJJI		
				오대	JBJJO		
		경북	상주	일품	KBSJI		
				오대	KBSJO		
		경남	밀양	일품	KNMYI		
		중 국	중국	흑룡강성	하얼빈		HJHB
				흑룡강성	허강		HJHG
허난성	신샹				HNXN		
랴오닝성	후루다오				LNHD		
길림성	연변 조선족 자치주				JLYB		

④ 휘발성분의 정성 및 통계 분석

- SPME법으로 추출한 쌀의 휘발성 대사체는 non-targeted analysis 되었으며, XCMS software가 사용되었다. hexane에 희석한 saturated alkanes C₇~C₃₀ (1 mg/mL in hexane)을 외부 표준물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI를 구한 후 문헌상의 RI값과 비교하였다. 분석된 모든 휘발성 대사체는 내부표준물질인 ethyl 2-methyl butyrate (100 mg/L)를 기준으로 RT 값이 보정되었다.
- XCMS에서 추출한 데이터로 SIMCA P+ software (SIMCA-P version 16.0, Umetrics)에서 다변량 통계분석을 실시하여 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)를 이용한 시료간의 차이를 확인하였다.
- 국내산, 수입산 백미의 휘발성 대사체로 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)을 수행한 결과 두 그룹의 PCA component 1은 45.6%, PCA component 3은 13.5%의 설명력을 나타내어 총 59.1%으로 설명되었고, PLS-DA component1은 44.3%, PLS-DA component 2는 12.0%의 설명력을 나타내어 총 56.3%로 설명되었다 ($R^2X = 0.614$, $R^2Y = 0.865$, $Q^2 = 0.833$) (그림 44). PLS-DA score plot 결과를 살펴보면, 수입산 백미는 PLS component 1과 PLS component2의 양의 방향에 위치하였다. QC 시료의 경우, PLS-DA 분석 결과에서 PLS component 1의 기준으로 양의 방향에 모여 위치하였다.
- 직교부분최소자승판별 분석 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)은 classification을 통해 집합이라는 종속변수를 부여해 데이터의 시각화를 극대화하고 실험군 간 차이가 있는 대사물질을 찾을 수 있는 통계 기법으로 예측 모델을 확립하고 구분에 기여하는 대사물질을 찾기 위해 사용되는 적합한 방법이다 (Bylesjo et al., 2006). 구분에 기여하는 대사물질을 찾기 위해 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였다 (그림 45). QC 시료를 제외한 수입산, 국내산 백미의 휘발성 대사체로 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행한 결과, 국내산 백미와 수입산 백미는 OPLS component 1에 의해 분리되었다. ($R^2X = 0.618$, $R^2Y = 0.897$, $Q^2 = 0.869$)
- OPLS-DA 분석을 통해 VIP list를 얻어 PLS component 1의 구분에 영향을 미치는 주요 peak를 추출하여 RI를 계산한 후 이를 문헌상의 RI와 비교하여 주요 성분을 분석하였다 (표 27). VIP가 0.7이상인 휘발성 대사체만 선정해 분석하였다. OPLS component 1에 대해 양의 방향에 기여하는 VIP로는 alcohol류 1개, aldehyde류 1개, ester류 1개, hydrocarbons 1개의 성분이 동정되었고, OPLS component 1에 대해 음의 방향에 기여하는 VIP로는 hydrocarbons 8개, ketone류 1개의 성분이 동정되었다.

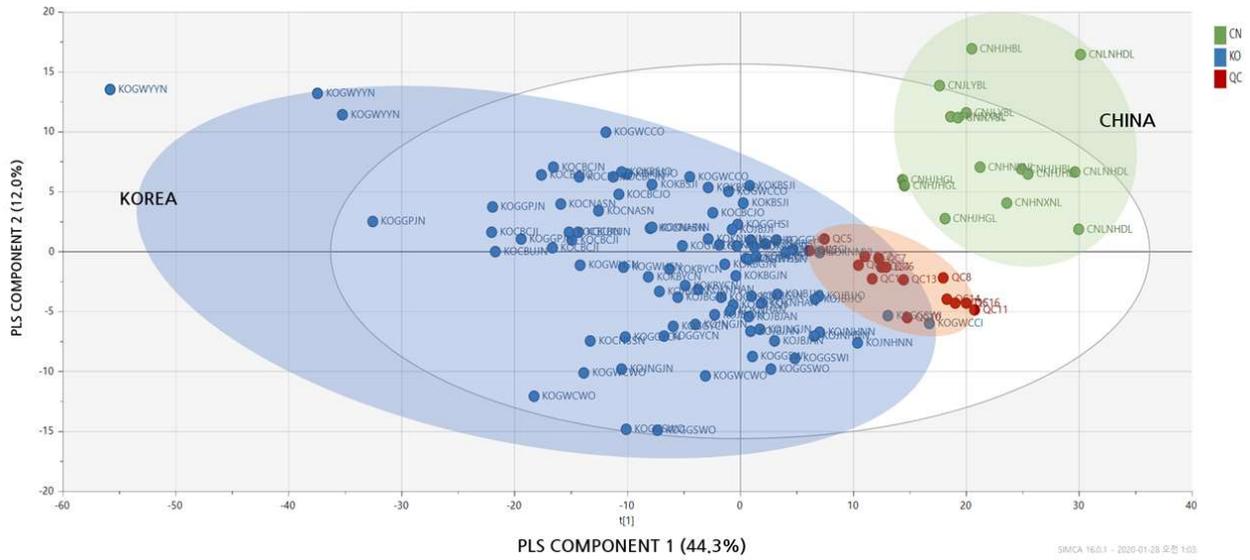


그림 44. 국내산, 수입산 백미의 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot.

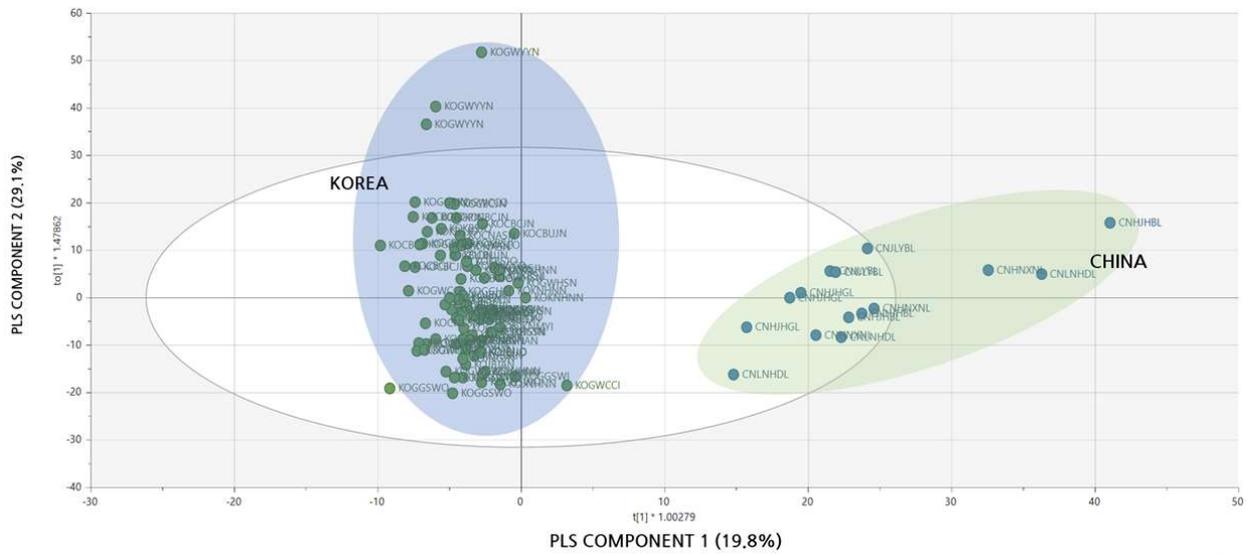


그림 45. 국내산, 수입산 백미의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

표 27. 백미 휘발성 대사체 OPLS-DA component1의 VIP list (>0.7)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
Negative direction						
1	1125		2,2,6-trimethyldecane	062237-97-2	1.11	MS
2	1095	1125	3,7-dimethyldecane	017312-54-8	1.09	MS/RI
3	1114		3-ethyl-4-methylhexane	003074-77-9	1.08	MS
4	1192	1192	decan-2-one	000693-54-9	1.07	MS/RI
5	1057		4-ethyl-2,2,6,6-tetramethylheptane	062108-31-0	1.07	MS
6	1031		2,5-dimethyloctane	015869-89-3	1.04	MS
7	1018		2,2-dimethylundecane	017312-64-0	1.00	MS
8	957		2,5,6-trimethyldecane	062108-23-0	0.92	MS
9	1070		2,2,8-trimethyldecane	062238-01-1	0.91	MS
Positive direction						
10	866	869	hexan-1-ol	000111-27-3	0.96	MS/RI
11	761	770	hexanal	000066-25-1	0.86	MS/RI
12	963	959	ethyl hexanoate	000123-66-0	0.76	MS/RI
13	1006		2,2-dimethyldecane	017302-37-3	0.76	MS

- 근거리에서 생산된 국내산 시료도 생산 지역 별로 구분되는지 알아보기 위해 국내에서 생산된 시료 (농산물품질관리원, 식량과학원 시료)만으로 다변량 통계분석을 수행하였다. 다변량 통계분석을 수행한 결과, 주성분 분석 (PCA)와 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)에서는 지역별로 구분이 되지 않고 중첩되어 모델 확립에 적합하지 않았다. 직교부분최소자승판별 분석(OPLS-DA)은 classification을 통해 집합이라는 종속변수를 부여해 데이터의 시각화를 극대화하고 실험군 간 차이가 있는 대사물질을 찾을 수 있는 통계 기법으로 예측 모델을 확립하고 구분에 기여하는 대사물질을 찾기 위해 직교부분최소자승판별 분석(OPLS-DA)를 수행하였다 (그림 46, 47).
- o 지역 별로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였을 때, 특징적으로 구분되는 시료는 없었다 ($R^2X = 0.831$, $R^2Y = 0.177$, $Q^2 = 0.081$) (그림 46). 더욱 정확한 분리 모델을 확립하기 위해, 위도 별 [고위도 ($37^{\circ} 00'00.0''N \sim 38^{\circ} 00'00.0''N$), 중위도 ($36^{\circ} 00'00.0''N \sim 37^{\circ} 00'00.0''N$), 저위도 ($35^{\circ} 00'00.0''N \sim 36^{\circ} 00'00.0''N$)]로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였다 ($R^2X = 0.837$, $R^2Y = 0.484$, $Q^2 = 0.3$) (그림 47). 지역 별로 class를 부여한 모델에 비해 위도 별로 class를 부여한 모델에서 조금 더 향상된 그룹 간 분리를 확인했으나 일부 시료가 중첩되어 완전하게 분리가 되지 않은 것을 확인하였다. 이는 특정 시료에서 유래 또는 그룹 간의 유사성이 크기 때문이라고 생각된다.
- 재배지역과 품종의 차이뿐만 아니라 다양한 요인에 의한 영향 때문에 구분이 되지 않는 것인지 확인하기 위하여 앞서 언급한 조건 외에 모든 조건을 동일하게 생산한 시료 (식량과학원 시료)에 대해서 다변량 통계분석을 실시하였다.

- 지역 별로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였을 때, 특징 적이게 그룹 지어지는 시료는 없었다 (그림 48).
- 더욱 정확한 분리 모델을 확립하기 위해, 위도 별 [고위도 (37° 00'00.0"N~ 38° 00'00.0"N), 중위도 (36° 00'00.0"N~37° 00'00.0"N), 저위도 (35° 00'00.0"N~ 36° 00'00.0"N)]로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였다 ($R^2Y = 0.902$, $Q^2 = 0.556$) (그림 49). 저위도에 속하는 경상남도와 전라북도 시료의 경우 OPLS1과 OPLS2의 양의 방향에 위치하였고, 중위도에 속하는 충청북도와 경상북도 시료의 경우 OPLS1의 음의 방향에 위치하였다. 또한 고위도에 속하는 강원도 경기도 시료의 경우 OPLS1의 양의 방향과 OPLS2의 음의 방향에 위치하였다. 지역별로 class를 부여한 모델과 비교하여 위도별로 class를 부여한 모델이 그룹 간 구별이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 구분에 기여하는 VIP 0.7 이상의 물질을 분석하였을 때, OPLS component 1에 대해 양의 방향에 기여하는 VIP로는 alcohol류 2개, ketone류 1개, hydrocarbons 8개의 성분이 동정되었고, OPLS component 1에 대해 음의 방향에 기여하는 VIP로는 aldehyde 2개의 성분이 동정되었다 (표 28).

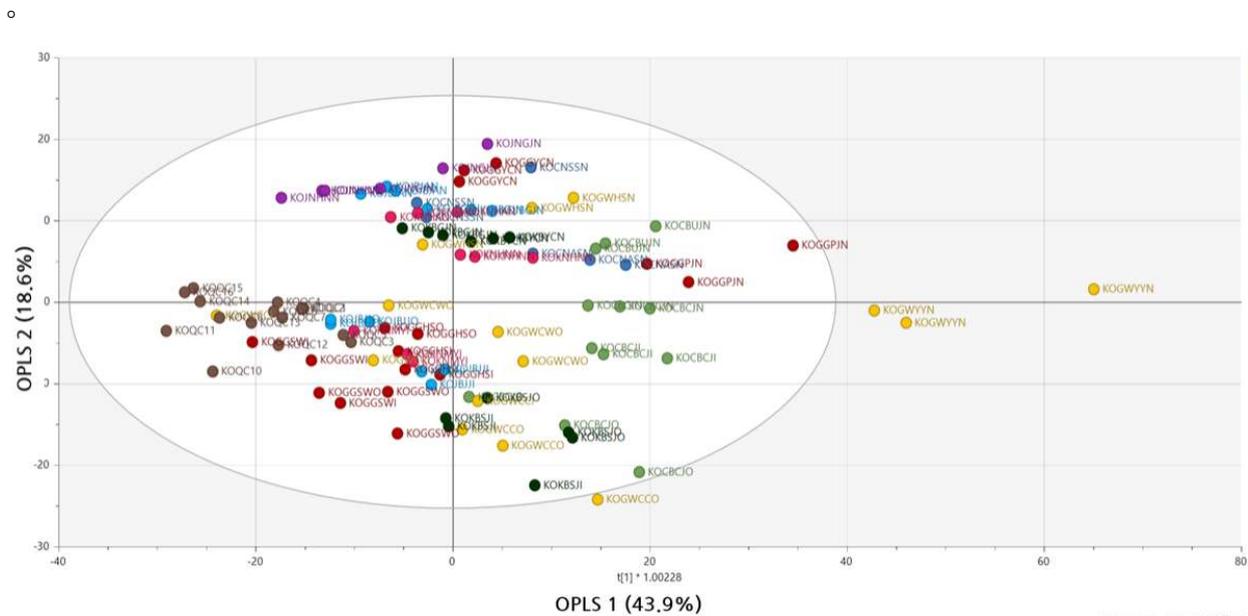


그림 46. 지역별 class를 부여한 국내산 백미 (농품원, 식량과학원 시료)의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

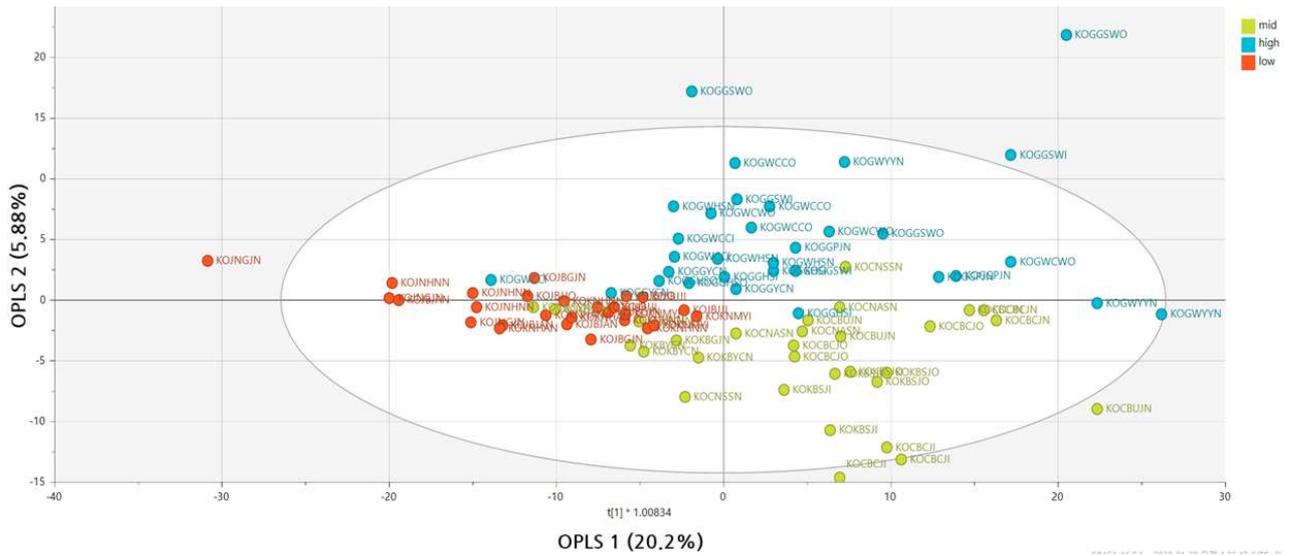


그림 47. 위도별 class를 부여한 국내산 백미 (농품원, 식량과학원 시료)의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

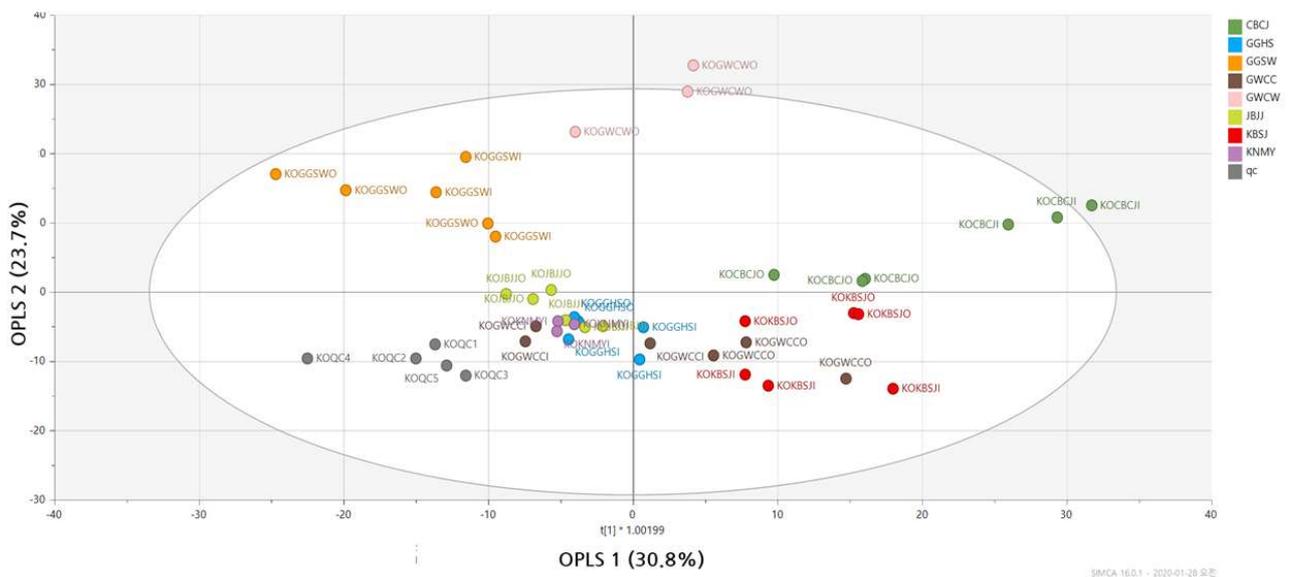


그림 48 지역별 class를 부여한 국내산 백미 (식량과학원 시료)의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

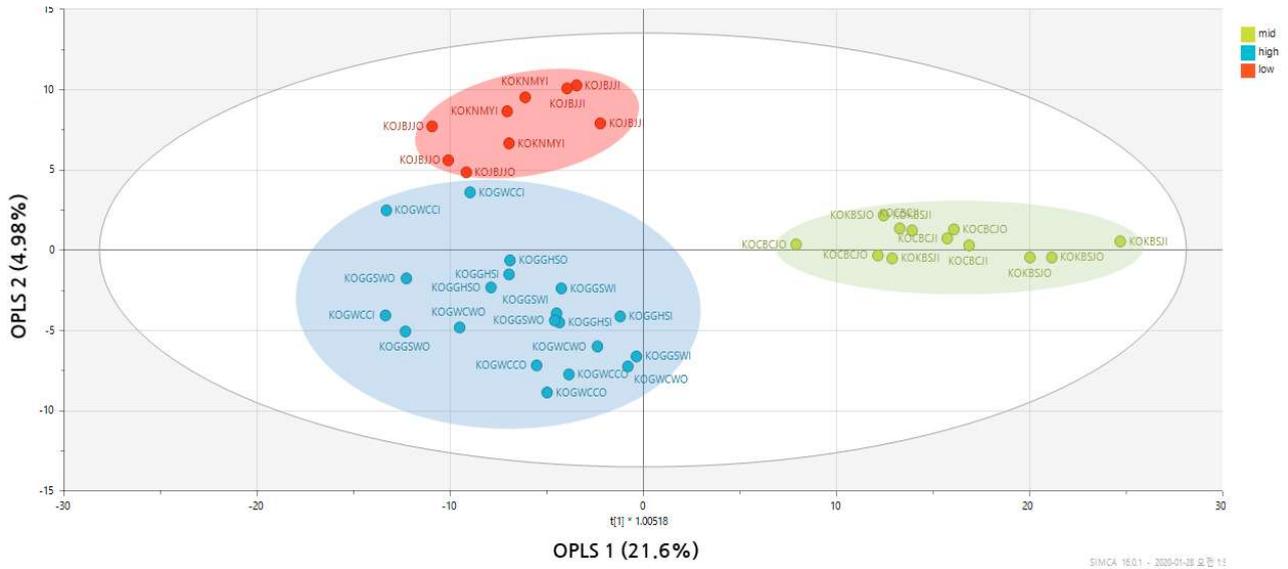


그림 49. 위도별 class를 부여한 국내산 백미 (식량과학원 시료)의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

표 28. 위도별 class를 부여한 국내산 백미 (식량과학원 시료) 휘발성 대사체 OPLS-DA component1의 VIP list (>0.7)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
Negative direction						
1	761	770	hexanal	000066-25-1	1.09	MS
2	700	699	pentanal	000110-62-3	0.80	MS/RI
Positive direction						
3	964	959	ethyl hexanoate	000123-66-0	1.43	MS/RI
4	1192	1192	decan-2-one	000693-54-9	1.26	MS/RI
5	1125		2,2,6-trimethyldecane	062237-97-2	1.21	MS
6	1114		3-ethyl-4-methylhexane	003074-77-9	1.18	MS
7	1094	1125	3,7-dimethyldecane	017312-54-8	1.15	MS/RI
8	1056		2,5,6-trimethyldecane	062108-31-0	1.11	MS
9	1030		2,5-dimethyloctane	015869-89-3	1.02	MS
10	1006		2,2-dimethyldecane	017302-37-3	0.97	MS
11	1070		2,2,8-trimethyldecane	062238-01-1	0.95	MS
12	865	865	hexan-1-ol	000111-27-3	0.87	MS
13	761	764	pentan-1-ol	000071-41-0	0.75	MS/RI

(라) 현미의 휘발성 대사체 추출 및 분석

① 시료 준비

- 환경적 요인에 의한 쌀의 휘발성 대사체 분석을 위해 식량과학원으로부터 환경적 요인을 제외한 다른 조건이 동일하게 2018년에 생산된 국내산 14종을 얻었다. 중국 현지에서 중국산 15종을 추가로 사용하였다.
- o 국내산 8개, 수입산 15개 지역 (표 29)
- o 식량과학원으로부터 얻은 모든 시료는 정미기 및 현미기(SY88-TH, 쌍용기계산업(주))를 이용해 현미를 얻었다.
- 휘발성 대사체 분석을 위한 시료의 목록은 위의 표 29과 같다.
- QC 시료로는 2018년에 재배된 국내산 쌀을 사용하였다. 일간 SPME 방법의 재현성 확보를 위해 시료 4개마다 QC 시료를 1개씩 분석하여 오차를 보정하였다.
- 분석에 사용된 모든 시료는 보관, 추출 등의 전처리 과정 중의 수분으로 인한 실험오차를 줄이기 위해 40°C의 dry oven에서 2시간 동안 건조하여 수분함량 10.5% 미만으로 조절한 후 사용되었다.

② SPME 추출

현미의 휘발성 대사체의 SPME를 이용한 추출방법 및 GC/MS 분석 방법

- SPME용 20 mL vial에 쌀 시료 5.0g을 넣어 crimp cap으로 밀봉하였다. 재현성을 높이기 위해 vial 6개씩 한 세트로 진행하였다. (QC 시료는 예외로 vial 1개씩 한 세트로 진행하였다.)
- 내부표준물질로는 ethyl 4-methylvalerate (CAS 25415-67-2, Sigma-Aldrich)이 사용되었으며, 용매는 methanol을 사용하였다.
- vial에 담긴 시료의 휘발성 성분을 흡착하기 위해 DVB/CAR/PDMS SPME fiber (Supelco)를 사용하였다. 시료의 휘발성 성분을 포집하기 위하여 시료를 담은 20 mL vial을 60°C에서 250 rpm으로 20분간 agitating하며 평형을 이룬 뒤 휘발성 성분을 20분간 흡착, 230°C에서 5분간 탈착하였다.

③ GC-MS를 이용한 휘발성 성분 분석

- SPME법을 이용하여 추출 시료의 휘발성 대사체 성분은 7890B GC system과 5977A MSD (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.
- Column은 DB-5MS (length 30m × inner diameter 0.250mm × film thickness 0.25 μm, Agilent Technologies)를 사용 하였다. Oven은 40°C에서 3분간 유지하고, 80°C까지 2°C/min으로 온도를 높여 5분간 머무른 후, 200°C까지 3°C/min 속도로 높여 분석하였다.
- 이동상 기체는 helium을 사용하여 0.8 mL/min로 흐르게 하였고, splitless mode로 설정하였다. mass spectra는 ionization energy는 70 eV로, mass scan range 35~350는 a.m.u.로 하였고, mass scan rate은 4.5 scan/sec으로 설정하였다.

표 29. 휘발성 대사체 분석에 사용한 현미시료

	Nation	Province	Location	Variety	Labeling	
식 량 과 학 원	대한민국	경기	화성	일품	GGHSI	
				오대	GGHSO	
			수원	일품	GGSWI	
				오대	GGSWO	
			강원	철원	오대	GWCWO
				춘천	일품	GWCCI
		오대	GWCCO			
		충북	청주	일품	CBCJI	
				오대	CBCJO	
		전북	전주	일품	JBJSI	
				오대	JBJSO	
		경북	상주	일품	KBSJI	
				오대	KBSJO	
경남	밀양	일품	KNMYI			
중 국	중국	흑룡강성	하얼빈		HJHB	
		흑룡강성	허강		HJHG	
		흑룡강성	쌍야산		HJSY	
		흑룡강성	자무쓰		HJJS	
		랴오닝성	후루다오		LNHD	
		허난성	상구		HNSQ	
		허난성	난양		HNNY	
		허난성	신상		HNXN	
		장쑤성	타이저우		JSTZ	
		산둥성	짜오좡		SDZZ	
		산둥성	런이		SDLY	
		산둥성	태안		SDTA	
		산서성	창지		SXCZ	
		호북성	황강		HBHG	
		쓰촨성	난충		SCNC	

④ 휘발성분의 정성 및 통계 분석

- SPME법으로 추출한 쌀의 휘발성 대사체는 non-targeted analysis 되었으며, XCMS software 가 사용되었다. hexane에 희석한 saturated alkanes C₇~C₃₀ (1 mg/mL in hexane)을 외부 표준 물질로 사용하여 각 휘발성분의 RI를 구한 후 문헌상의 RI값과 비교하였다. 분석된 모든 휘발성 대사체는 내부표준물질인 ethyl 4-methylvalerate (100 mg/L)를 기준으로 RT 값이 보정되었다.
- XCMS에서 추출한 데이터로 SIMCA P+ software (SIMCA-P version 16.0, Umetrics)에서 다변량 통계분석을 실시하여 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 관별 분석 (PLS-DA)를 이용한 시료간의 차이를 확인하였다 (그림 50, 51).

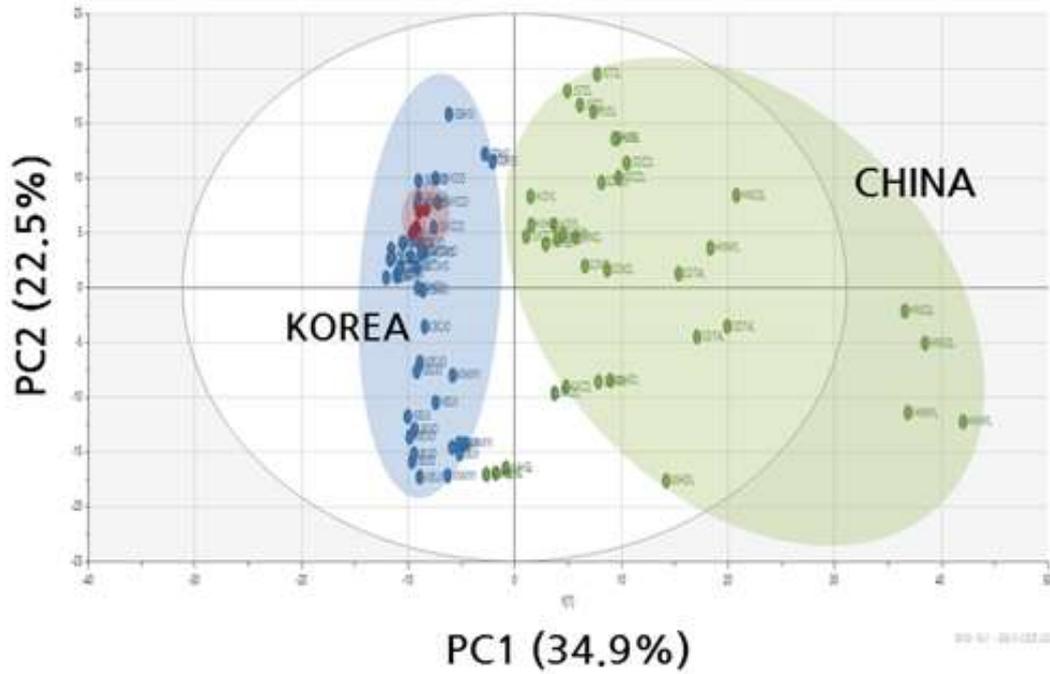


그림 50. 국내산, 수입산 현미의 휘발성 대사체의 PCA score plot.

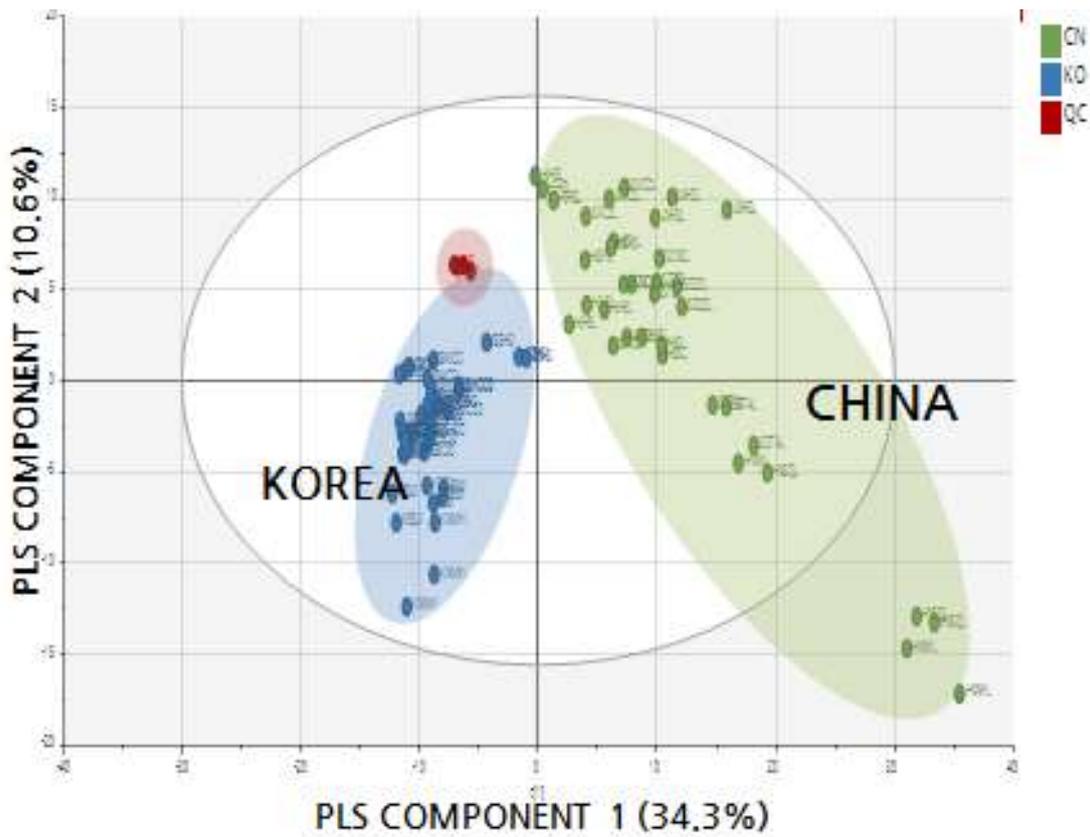


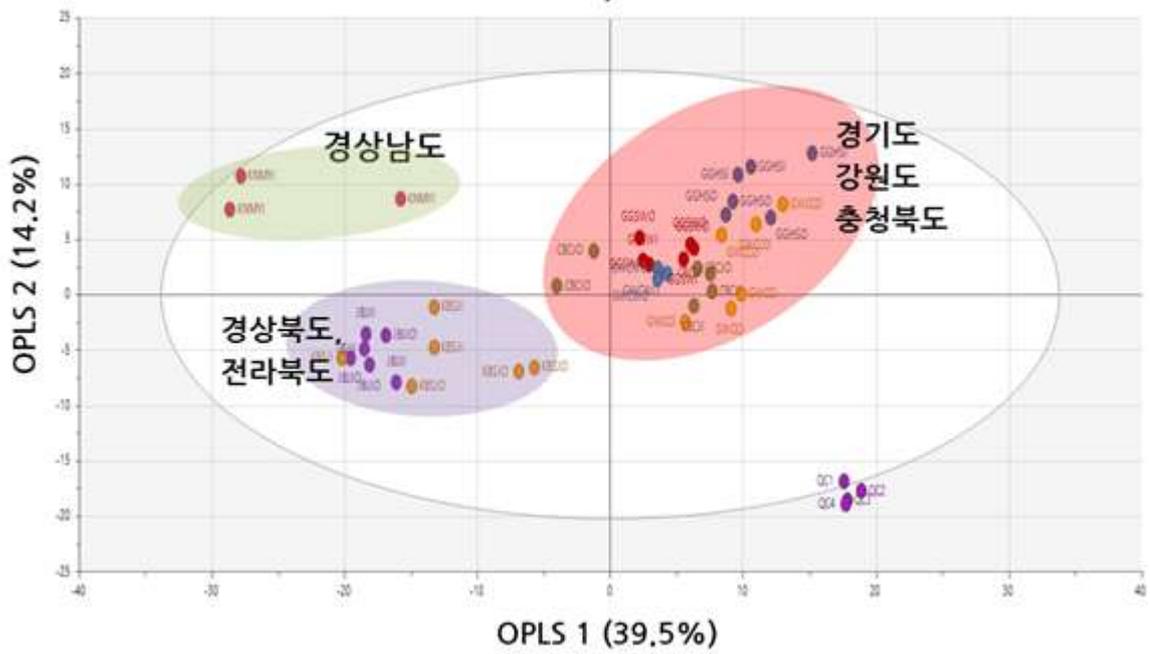
그림 51. 국내산, 수입산 현미의 휘발성 대사체의 PLS-DA score plot.

- 국내산, 수입산 현미의 휘발성 대사체로 주성분 분석 (PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)을 수행한 결과 두 그룹의 PCA component 1은 34.9%, PCA component 2은 22.5%의 설명력을 나타내어 총 57.4%으로 설명되었고 (그림 50), PLS-DA component1은 34.3%, PLS-DA component 2는 10.6%의 설명력을 나타내어 총 44.9%로 설명되었다 ($R^2X = 0.625$, $R^2Y = 0.894$, $Q^2 = 0.872$) (그림 51). 국내산 현미는 PLS component 1의 기준으로 음의 방향에 위치하고 있으며, 수입산 현미는 PLS component 1의 기준으로 양의 방향에 위치하였다. 국내산 현미와 수입산 현미는 PLS component 1을 기준으로 서로 차이를 보인다. QC 시료의 경우, PLS-DA 분석 결과에서 PLS component 1의 기준으로 음의 방향에 모여 위치하였다. 이는 QC 시료가 국내에서 생산된 시료이기 때문에 PLS-DA score plot 상에서 국내산 시료와 같은 방향에 위치한 것으로 생각된다.
- PLS-DA 분석을 통해 VIP list를 얻어 PLS component 1의 구분에 영향을 미치는 주요 peak를 추출하여 RI를 계산한 후 이를 문헌상의 RI와 비교하여 주요 성분을 분석하였다 (표 30). VIP가 0.7이상인 휘발성 대사체만 선정해 분석하였다. PLS-DA component 1에 대해 음의 방향에 기여하는 대사체로는 alcohol류 2개, aldehyde류 5개, ester류 8개의 성분이 동정되었고, PLS-DA component 1에 대해 양의 방향에 기여하는 대사체로는 alcohol류 3개, aldehyde류 4개, ester류 2개, ketone류 1개, furan 계열 1개, hydrocarbon류 9개의 성분이 동정되었다.
- VIP 값은 변수 선택에 따라 변경되는 상대적인 값으로 VIP 값만으로 최적의 바이오 마커를 선택하기 어려운 경우가 많아, 모델과 원본데이터 사이의 상관계수인 $p(\text{corr})$ 값을 고려하여 최적의 바이오마커로 선택한다 (Wheelock et al., 2013). 이들 중 VIP가 1.0 이상이고 $|p(\text{corr})| > 0.5$ 이상인 것들을 PLS component 1의 양의 방향과 음의 방향으로 영향을 미치는 주요 인자로 선정하였다. 위의 분석 결과로 보아 현미의 원산지 판별에는 alcohol류인 hexan-1-ol, aldehyde류인 heptanal, (E)-hept-2-enal, furan류인 2-pentylfuran, ester류인 methyl acetate, methyl nonanoate, methyl pentanoate, hydrocarbon류인 tetradecane, dodecane, (Z)-9-methylundec-5-ene, 3-methyl-5-propylnonane, 3,6-dimethyloctane 등이 높은 기여도를 가지는 것으로 나타났다.

표 30. 현미 휘발성 대사체 PLS-DA component1의 VIP list (>0.7)

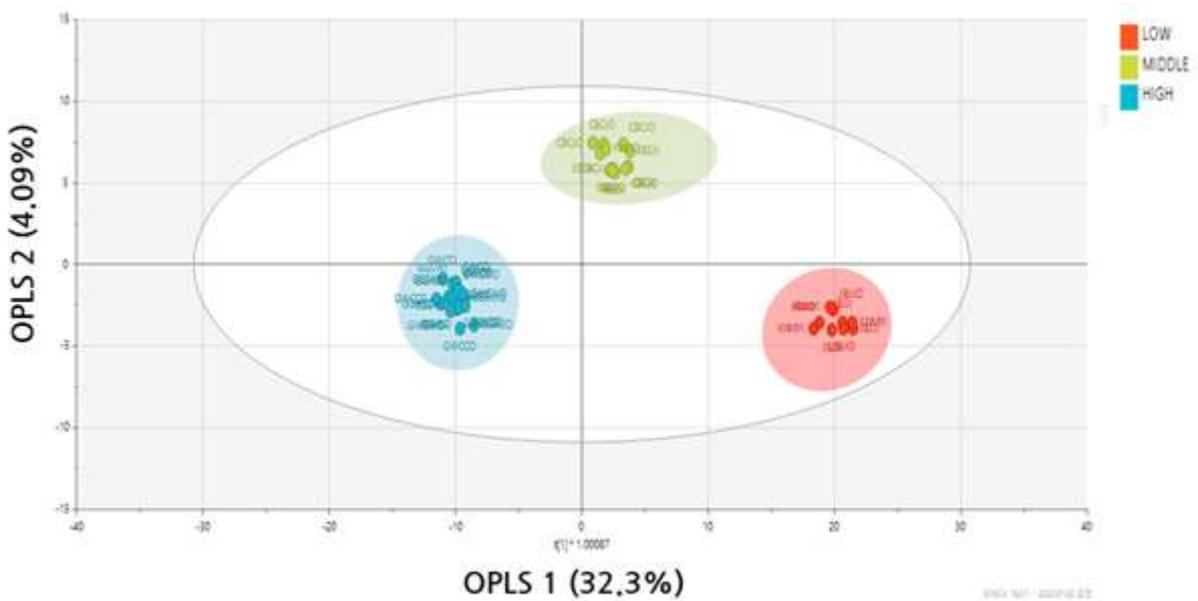
No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
Negative direction						
1	<600	522	methyl acetate	000079-20-9	1.17	MS/RI
2	1217	1227	methyl nonanoate	001731-84-6	1.13	MS/RI
3	821	823	methyl pentanoate	000624-24-8	1.06	MS/RI
4	901	896	heptanal	000111-71-7	1.06	MS/RI
5	922	910	methyl hexanoate	000106-70-7	1.00	MS/RI
6	699	699	pentanal	000110-62-3	0.94	MS/RI
7	800	802	hexanal	000066-25-1	0.90	MS/RI
8	1020	1021	methyl heptanoate	000106-73-0	0.95	MS/RI
9	1723	1726	methyl tetradecanoate	000124-10-7	0.94	MS/RI
10	1126	1120	methyl octanoate	000111-11-5	0.92	MS/RI
11	1001	1001	octanal	000124-13-0	0.87	MS/RI
12	968	970	heptan-1-ol	000111-70-6	0.85	MS/RI
13	760	764	pentan-1-ol	000071-41-0	0.75	MS/RI
14	1103	1102	nonanal	000124-19-6	0.78	MS/RI
Positive direction						
15	1399	1400	tetradecane	000629-59-4	1.48	MS/RI
16	1199	1200	dodecane	000112-40-3	1.34	MS/RI
17	1115		(Z)-9-methylundec-5-ene	074630-65-2	1.15	MS
18	1028		3-methyl-5-propylnonane	031081-18-2	1.15	MS
19	1057		3,6-dimethyloctane	015869-94-0	1.14	MS
20	1047		3-ethyl-2,2-dimethylpentane	016747-32-3	1.13	MS
21	1030		4,6-dimethylundecane	017312-82-2	1.12	MS
22	1024		2,2,4-trimethyldecane	062237-98-3	1.12	MS
23	866	869	hexan-1-ol	000111-27-3	1.11	MS/RI
24	987	993	2-pentylfuran	003777-69-3	1.07	MS/RI
25	1584	1587	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	006846-50-0	1.05	MS/RI
26	953	959	(E)-hept-2-enal	018829-55-5	1.04	MS/RI
27	1368		(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	074367-34-3	0.95	MS
28	<600	583	butanal	000123-72-8	0.86	MS/RI
29	1050	1061	(E)-oct-2-enal	002363-89-5	0.85	MS/RI
30	1261	1252	(Z)-dec-2-enal	002497-25-8	0.78	MS/RI
31	1065	1070	octan-1-ol	000111-87-5	0.76	MS/RI
32	888	889	heptan-2-one	000110-43-0	0.76	MS/RI
33	649	653	butan-1-ol	000071-36-3	0.74	MS/RI

- 근거리에서 생산된 국내산 시료도 생산 지역 별로 구분되는지 알아보기 위해 국내에서 생산된 시료만으로 다변량 통계분석을 수행하였다. 다변량 통계분석을 수행한 결과, 주성분 분석(PCA)와 부분 최소 제곱 판별 분석 (PLS-DA)에서는 지역별로 구분이 되지 않고 중첩되어 모델 확립에 적합하지 않았다. 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였을 때, 그룹간의 차이가 첫 번째 벡터에 나타내도록 함으로써 다른 다변량 통계분석법과 비교하여 더욱 향상된 지역 간의 구분을 확인할 수 있었다 (그림 52, 53).
- o 지역 별로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였을 때, OPLS1의 양의 방향에는 경기도, 강원도, 충청북도 시료가 위치하였으며, OPLS1의 음의 방향과 OPLS2 양의 방향에는 경상남도 시료가, OPLS1의 음의 방향과 OPLS2 음의 방향에는 전라북도, 경상북도 시료가 위치하였다 ($R^2Y = 0.837$, $Q^2 = 0.686$) (그림 52). 이러한 그룹의 위치를 대한민국 지도 상에서 볼 때, 위도로 구분되는 것을 확인하였다. 이러한 구분에 기여하는 물질을 분석하였을 때 ($VIP > 0.7$ 이상), alcohol류 6개, aldehyde류 9개, ester류 11개, ketone류 2개, furan 계열 1개, hydrocarbon류 6개의 성분이 동정되었다 (표 31). 그 중에서 ketone류인 6-methylhept-5-en-2-one, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one, ester류인 methyl pentanoate, methyl hexanoate, aldehyde류인 octanal이 분리에 기여하는 주요 대사물질로 동정되었다 ($VIP > 1.0$, $|p(\text{corr})| > 0.5$).
- o 더욱 정확한 분리 모델을 확립하기 위해, 위도 별 [고위도 ($37^\circ 00'00.0''N \sim 38^\circ 00'00.0''N$), 중위도 ($36^\circ 00'00.0''N \sim 37^\circ 00'00.0''N$), 저위도 ($35^\circ 00'00.0''N \sim 36^\circ 00'00.0''N$)]로 class를 부여하여 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 수행하였다 ($R^2Y = 0.985$, $Q^2 = 0.852$) (그림 53). 고위도에 속하는 강원도 경기도 시료의 경우 OPLS1의 양의 방향에 위치하였고, 중위도에 속하는 충청북도와 경상북도 시료의 경우 OPLS2의 양의 방향에 위치하였다. 또한 저위도에 속하는 경상남도와 전라북도 시료의 경우 OPLS1과 OPLS2의 음의 방향에 위치하였다. 지역별로 class를 부여한 모델과 비교하여 위도별로 class를 부여한 모델이 그룹간 구별이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 구분에 기여하는 $VIP > 0.7$ 이상의 물질을 분석하였을 때, alcohol류 7개, aldehyde류 8개, ester류 11개, ketone류 2개, furan 계열 1개, hydrocarbon류 5개의 성분이 동정되었다 (표 32). 그 중에서 alcohol 류인 2-methylbut-3-en-2-ol, octan-1-ol, butan-1-ol, ester류인 methyl hexadecanoate, methyl heptanoate, [2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methyl propanoate, aldehyde 류인 octanal, heptanal, (E)-oct-2-enal 이 분리에 기여하는 주요 대사물질로 동정되었다. ($VIP > 1.0$, $|p(\text{corr})| > 0.5$)
- 앞서 분석한 백미 휘발성 대사체의 다변량 통계 분석 결과와 현미 휘발성 대사체의 다변량 통계분석 결과를 비교하였을 때, 적합한 원산지 분리 모델을 만들어내기에 백미보다 현미의 휘발성 대사체가 더 유용하다고 생각되어진다. 이는 현미에 더 많은 휘발성 대사체가 존재하며, 백미로 도정 시에 서로 다른 도정 기계와 도정 정도, 도정 과정에 휘발성 대사체가 영향을 받기 때문이라고 사료된다.



SMCA 101 - 2024-01-27

그림 52. 지역별 class를 부여한 현미의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.



SMCA 101 - 2024-01-27

그림 53. 위도별 class를 부여한 현미의 휘발성 대사체의 OPLS-DA score plot.

표 31. 지역별 class를 부여한 현미 휘발성 대사체 OPLS-DA component 1의 VIP list (>0.7)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
1	1368		(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	074367-34-3	1.24	MS
2	866	869	hexan-1-ol	000111-27-3	1.21	MS/RI
3	982	988	6-methylhept-5-en-2-one	000110-93-0	1.14	MS/RI
4	821	823	methyl pentanoate	000624-24-8	1.11	MS/RI
5	1399	1400	tetradecane	000629-59-4	1.11	MS/RI
6	1322	1324	methyl decanoate	000110-42-9	1.10	MS/RI
7	649	653	butan-1-ol	000071-36-3	1.09	MS/RI
8	699	699	pentanal	000110-62-3	1.09	MS/RI
9	1723	1726	methyl tetradecanoate	000124-10-7	1.06	MS/RI
10	1307	1300	tridecane	000629-50-5	1.06	MS/RI
11	1199	1200	dodecane	000112-40-3	1.05	MS/RI
12	968	970	heptan-1-ol	000111-70-6	1.05	MS/RI
13	1001	1001	octanal	000124-13-0	1.03	MS/RI
14	922	910	methyl hexanoate	000106-70-7	1.02	MS/RI
15	1839	1844	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	000502-69-2	1.02	MS/RI
16	760	764	pentan-1-ol	000071-41-0	1.01	MS/RI
17	987	993	2-pentylfuran	003777-69-3	0.98	MS/RI
18	1126	1120	methyl octanoate	000111-11-5	0.98	MS/RI
19	<600	522	methyl acetate	000079-20-9	0.98	MS/RI
20	1584	1587	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy) pentyl] 2-methylpropanoate	006846-50-0	0.97	MS/RI
21	1900<	1913	methyl hexadecanoate	000112-39-0	0.97	MS/RI
22	800	802	hexanal	000066-25-1	0.96	MS/RI
23	1185	1192	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	000112-34-5	0.96	MS/RI
24	1020	1021	methyl heptanoate	000106-73-0	0.96	MS/RI
25	1205	1207	decanal	000112-31-2	0.95	MS/RI
26	901	896	heptanal	000111-71-7	0.95	MS/RI
27	<600	583	butanal	000123-72-8	0.95	MS/RI
28	1217	1227	methyl nonanoate	001731-84-6	0.94	MS/RI
29	699	699	pentanal	000110-62-3	0.94	MS/RI
30	1296		5-methyl-5-propylnonane	017312-75-3	0.94	MS
31	1103	1102	nonanal	000124-19-6	0.93	MS/RI
32	1599	1600	hexadecane	000544-76-3	0.91	MS/RI
33	1045		3,6-dimethyloctane	015869-94-0	0.90	MS
34	698	699	pentanal	000110-62-3	0.90	MS/RI
35	1050	1061	(E)-oct-2-enal	002363-89-5	0.87	MS/RI
36	1065	1070	octan-1-ol	000111-87-5	0.78	MS/RI

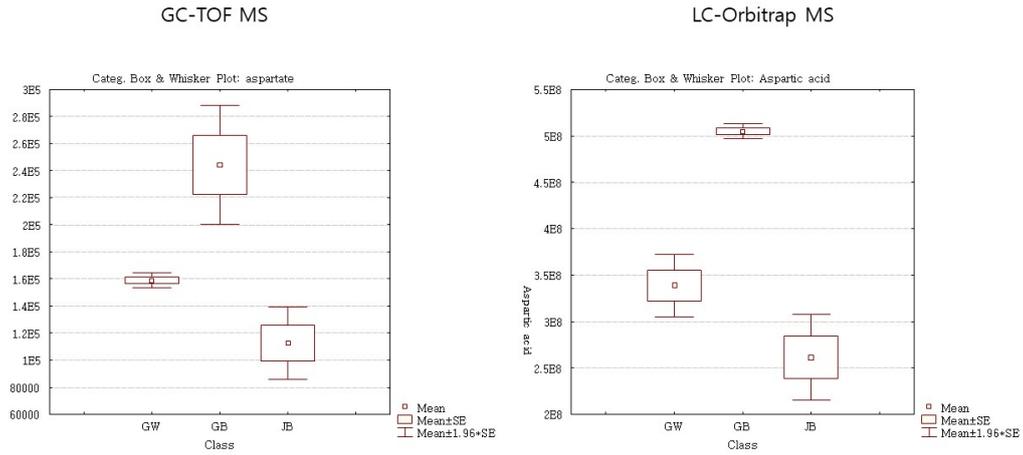
표 32. 위도별 class를 부여한 현미 휘발성 대사체 OPLS-DA component 1의 VIP list (>0.7)

No.	RI	Ref RI	Volatile Compounds	CAS #	VIP value	ID
1	1001	1001	octanal	000124-13-0	.1.16	MS/RI
2	1584	1587	[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	006846-50-0	1.15	MS/RI
3	1103	1102	nonanal	000124-19-6	1.14	MS/RI
4	1090	1079	2-methylbut-3-en-2-ol	000115-18-4	1.12	
5	968	970	heptan-1-ol	000111-70-6	1.11	MS/RI
6	922	910	methyl hexanoate	000106-70-7	1.11	MS/RI
7	1020	1021	methyl heptanoate	000106-73-0	1.09	MS/RI
8	1065	1070	octan-1-ol	000111-87-5	1.09	MS/RI
9	649	653	butan-1-ol	000071-36-3	1.08	MS/RI
10	1050	1061	(E)-oct-2-enal	002363-89-5	1.07	MS/RI
11	821	823	methyl pentanoate	000624-24-8	1.07	MS/RI
12	1126	1120	methyl octanoate	000111-11-5	1.06	MS/RI
13	987	993	2-pentylfuran	003777-69-3	1.05	MS/RI
14	901	896	heptanal	000111-71-7	1.04	MS/RI
15	1900<	1913	methyl hexadecanoate	000112-39-0	1.02	MS/RI
16	1217	1227	methyl nonanoate	001731-84-6	1.02	MS/RI
17	1020	1021	methyl heptanoate	000106-73-0	1.01	MS/RI
18	1839	1844	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	000502-69-2	0.94	MS/RI
19	1045		3,6-dimethyloctane	015869-94-0	0.92	MS
20	1307	1300	tridecane	000629-50-5	0.88	MS/RI
21	1599	1600	hexadecane	000544-76-3	0.88	MS/RI
22	1185	1192	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	000112-34-5	0.88	MS/RI
23	982	988	6-methylhept-5-en-2-one	000110-93-0	0.88	MS/RI
24	1296		5-methyl-5-propylnonane	017312-75-3	0.87	MS
25	760	764	pentan-1-ol	000071-41-0	0.87	MS/RI
26	1322	1324	methyl decanoate	000110-42-9	0.87	MS/RI
27	866	869	hexan-1-ol	000111-27-3	0.84	MS/RI
28	<600	522	methyl acetate	000079-20-9	0.84	MS/RI
29	1205	1207	decanal	000112-31-2	0.83	MS/RI
30	699	699	pentanal	000110-62-3	0.83	MS/RI
31	1199	1200	dodecane	000112-40-3	0.81	MS/RI
32	1399	1400	tetradecane	000629-59-4	0.80	MS/RI
33	1368		(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	074367-34-3	0.80	MS
34	<600	583	butanal	000123-72-8	0.72	MS/RI

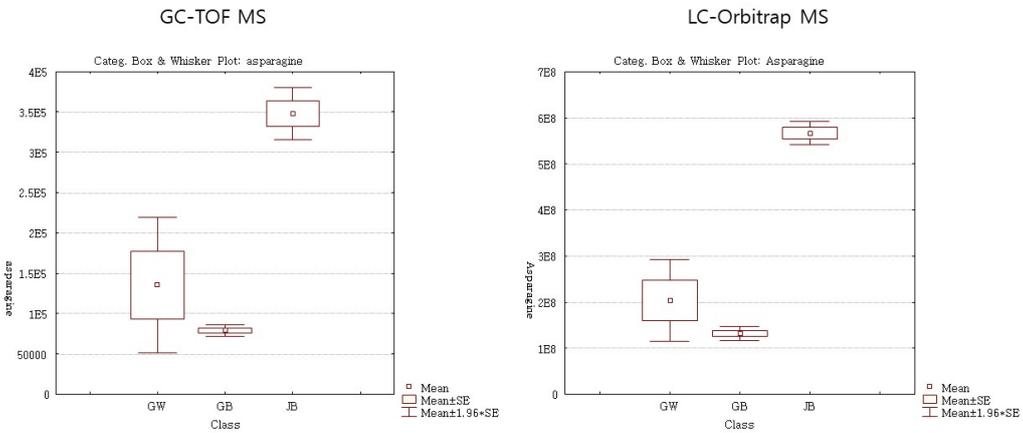
(6) 서로 다른 플랫폼에서 얻은 대사체 결과 값 교차 및 검증

- GC-TOF 및 LC-Orbitrap MS에서 얻은 주요 대사체의 상대적 정량 값을 비교하고, 동일 대두 시료군 (GW, GB, JB)의 평균값과 표준편차 등을 구하고, 이를 Categ. Box & Whisker Plot으로 도식화하였다 (그림 54).
- 분석 대상 주요 대사체로는 asparagine, aspartate, GABA, glutamine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine 등 이었다.

Aspartate

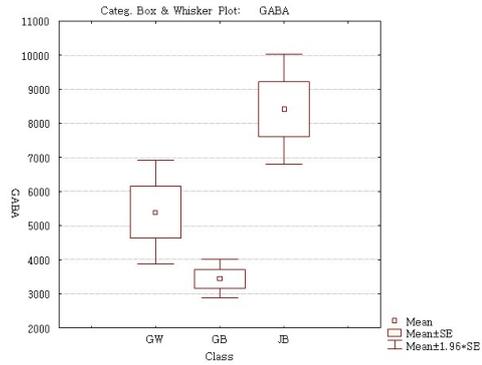


Asparagine

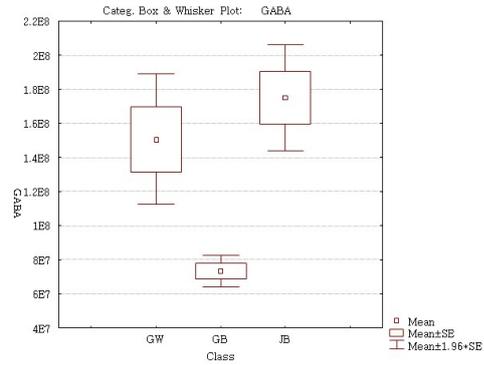


GABA

GC-TOF MS

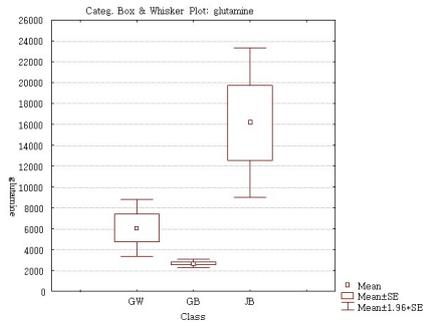


LC-Orbitrap MS

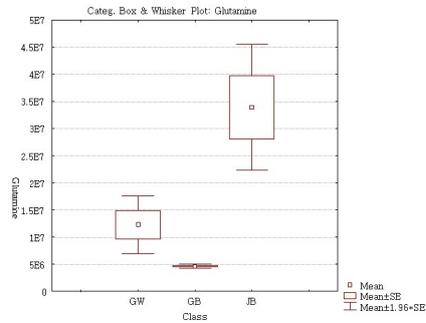


Glutamine

GC-TOF MS

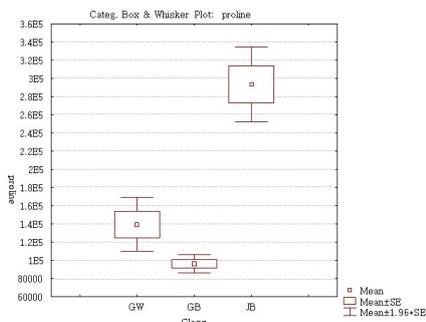


LC-Orbitrap MS

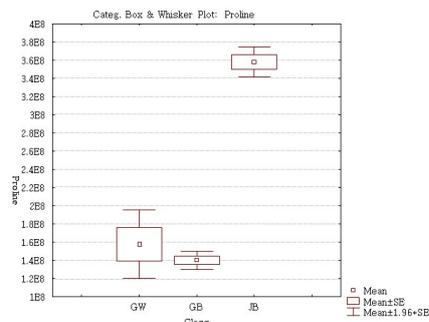


Proline

GC-TOF MS

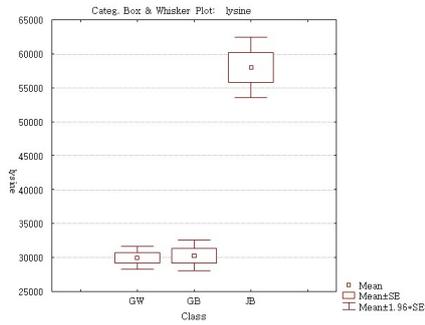


LC-Orbitrap MS

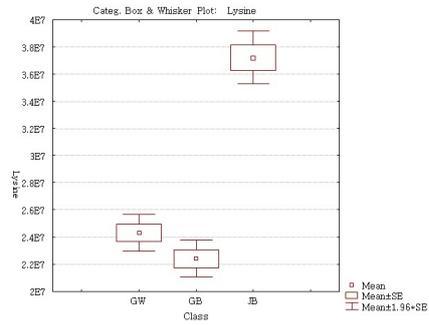


Lysine

GC-TOF MS

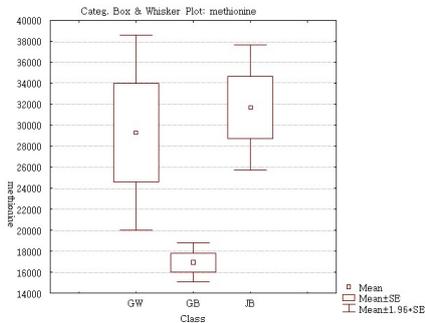


LC-Orbitrap MS

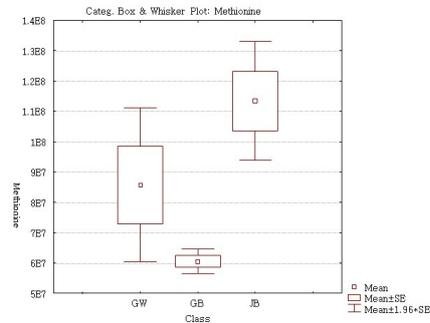


Methionine

GC-TOF MS

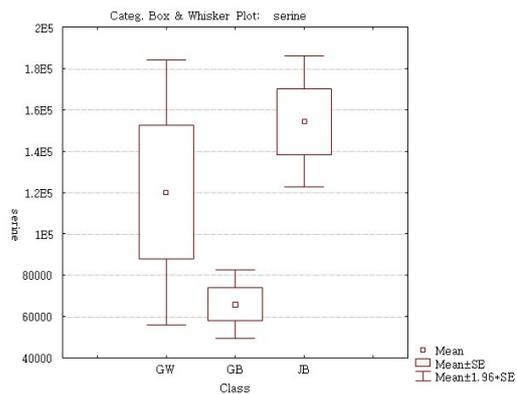


LC-Orbitrap MS

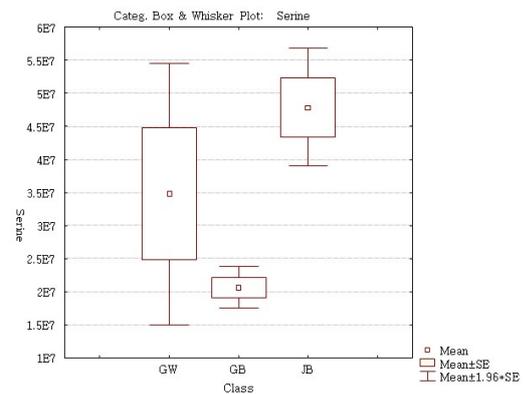


Serine

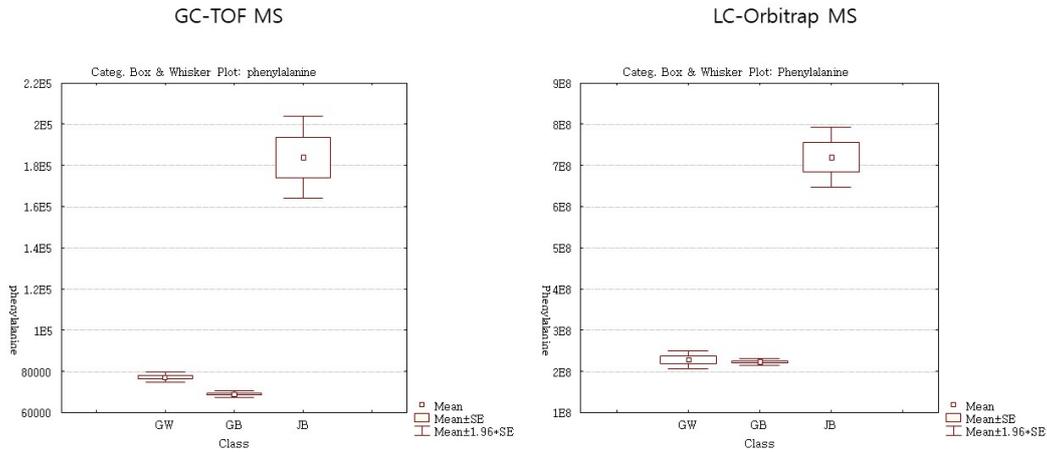
GC-TOF MS



LC-Orbitrap MS



Phenylalanine



Threonine

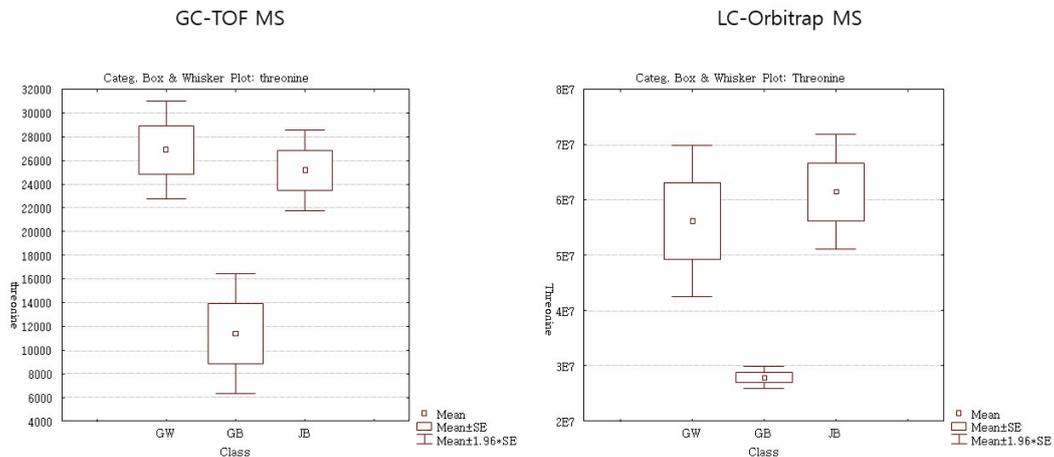


그림 54. GC-MS와 LC-MS 결과 간의 교차검증 결과

- 서로 다른 그룹간의 결과 비교 시 전체적으로 결과 값들의 상대적인 비 (ratio) 및 패턴은 매우 유사함을 보여주었다. 이는 서로 다른 분석 장비로 얻은 결과 값들의 상호 보완 및 통합적인 DB 구축이 유용함을 나타내주고 있다.
- LC-MS 결과 값들의 표준편차에 비해 GC-TOFMS로 얻은 결과 값들의 표준편차가 상대적으로 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 이는 분석 장비 및 시료 전처리에 따른 차이점에 기인한 것으로 사료된다. GC-TOFMS로 분석 시 사용된 유도체화 과정이나 기타 다른 전처리 과정, 또는 GC의 injection 과정 중의 불안정성이 데이터의 정밀도에 영향을 주었을 것으로 사료된다.
- 시스템 수준의 상호비교 분석을 위하여, Pearson's correlation coefficient와 Spearman rank correlation coefficient 기반 Pattern Searching Algorithm을 적용하여 상호유사성 및 차이점을 규명하고 그에 따른 보완을 수행할 계획임

(7) 원산지 검증 모델 수립

- 농산물 (대두, 참깨, 쌀)의 휘발성 대사체 분석 다변량 통계기법(PLS-DA, OPLS-DA)을 사용하여 수립한 모델의 cross-validation을 하기 위하여 Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis를 수행하였다. ROC analysis는 데이터의 민감도와 특이도를 이용하는 그래프로 가로축은 특이도, 세로축은 민감도로 구성되어 진다. 이때 area under the curve (AUC) 값은 1.0에 가까울수록 더욱 정확한 모델이며, 이를 이용해 모델의 적합성을 확인하였다. 또한, 다른 통계 software의 discriminant analysis를 이용해 선정된 바이오마커의 판별 정확도 분석을 수행하였다.

(가) 대두

- 2차년도 국내산 및 국외산 대두의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델을 ROC analysis를 통해 검증하였다. AUC value는 국내산-others, 중국산-others, 북미산-others 모두 1이다 (그림 55).

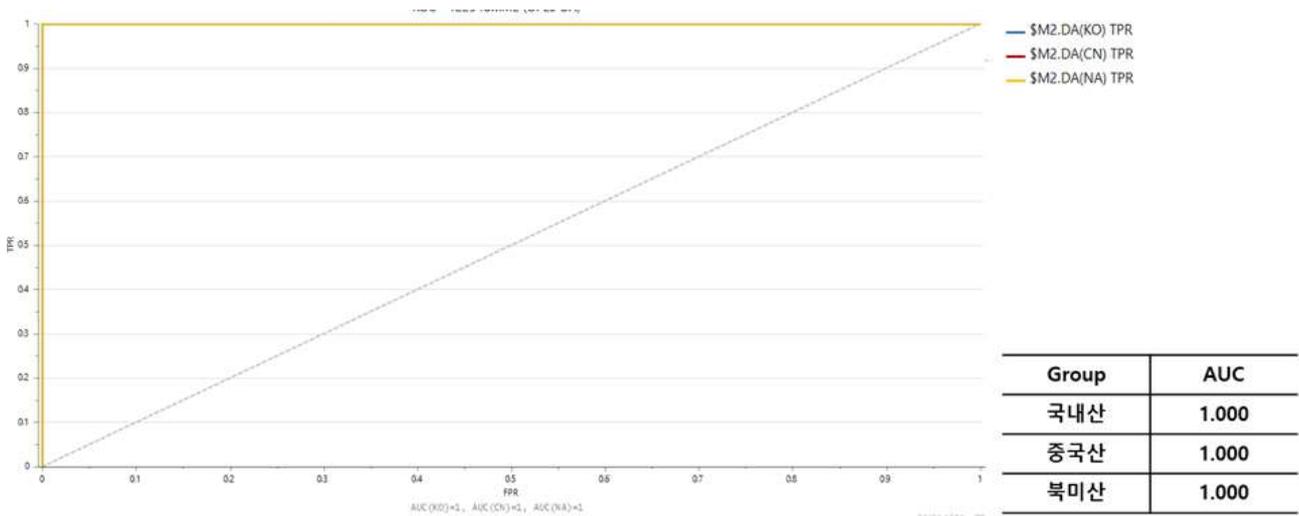


그림 55. ROC analysis를 통한 국내, 국외 대두 판별 모델검증

- 2차년도 국내산 및 국외산 대두의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델에서 얻어진 바이오마커 중 VIP 값이 $VIP > 1.5$ 인 휘발성 대사체를 선별하여 SPSS software (version 14.0, SPSS Inc, Chicago, Ill)를 이용하여 discriminant analysis를 수행하였다 (표 33).

표 33. 대두의 discriminant analysis 결과

		V1	예측 소속집단		전체
			국내산	국외산	
원래값	빈도	국내산	17	0	17
		국외산	0	19	19
	%	국내산	100.0	.0	100.0
		국외산	.0	100.0	100.0

a 원래의 집단 케이스 중 100.0%이(가) 올바르게 분류되었습니다.

- discriminant analysis 결과, 국내산 및 국외산 대두가 100% 판별율을 보였다.

(나) 참깨

- 3차년도 국내산 및 국외산 참깨의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델을 ROC analysis을 통해 검증하였다. AUC value는 국내산-others, 아시아산-others, 아프리카산-others 모두 1이다 (그림 56).

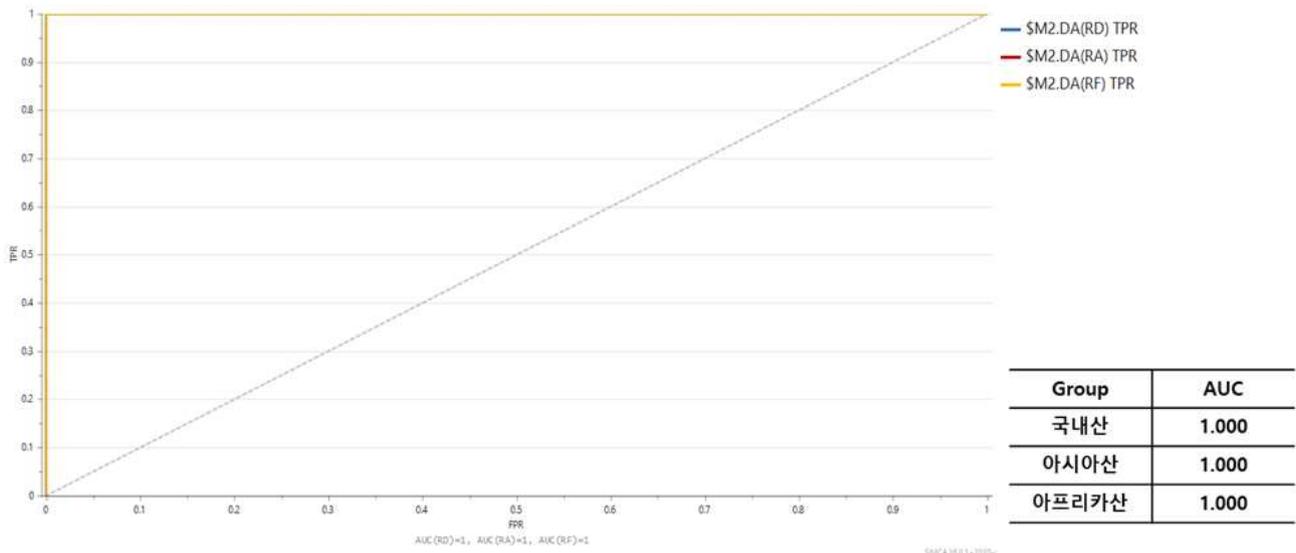


그림 56. ROC analysis를 통한 국내, 국외 대두 판별 모델검증

- 3차년도 국내산 및 국외산 참깨의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델이 정확한지를 알아보기 위해 R software를 이용하여 linear discriminant analysis를 수행하였다 (표 34).

표 34. 볶은 참깨의 linear discriminant analysis 결과

	V1	예측 소속집단		전체
		국내산	국외산	
빈도	국내산	81	0	81
	국외산	0	30	30
%	국내산	100.0	.0	100.0
	국외산	.0	100.0	100.0

- linear discriminant analysis 결과, 국내산 및 국외산 참깨가 100% 판별율을 보였다.

(다) 쌀

- 4차년도 국내산 및 국외산 백미의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델을 ROC analysis을 통해 검증하였다. AUC value는 국내산-others, 중국산-others 모두 1이다 (그림 57).

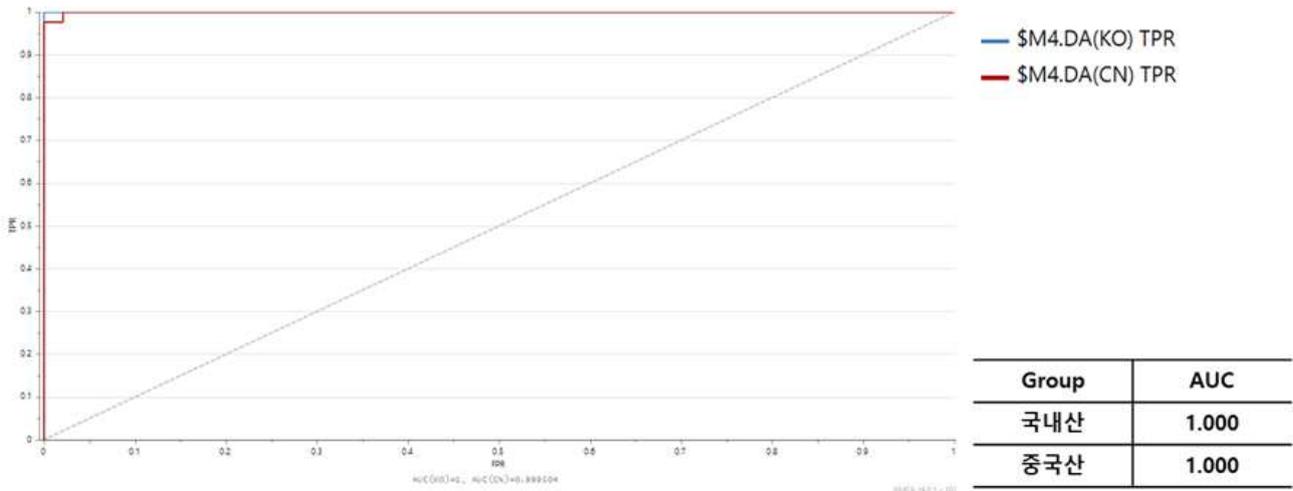


그림 57. ROC analysis를 통한 국내, 국외 쌀 판별 모델검증

- 4차년도 국내산 및 국외산 현미의 휘발성 대사체 분석 및 다변량 통계기법을 이용하여 수립한 원산지 판별 모델에서 얻어진 바이오마커 중 VIP 값이 $VIP > 1.5$ 인 휘발성 대사체를 선별하여 SPSS software를 이용하여 discriminant analysis를 수행하였다 (표 35).

표 35. 현미의 discriminant analysis 결과

		V1	예측 소속집단		전체
			국내산	국외산	
원래값	빈도	국내산	42	0	42
		국외산	0	42	42
%		국내산	100.0	.0	100.0
		국외산	.0	100.0	100.0

- discriminant analysis 결과, 국내산 및 국외산 쌀 100% 판별율을 보였다.

(8) 원산지 판별 검사 활용

- 2016년 생산된 대두 시료로 구축한 원산지 판별용 OPLS-DA 모델을 이용하여 misclassification test를 진행하였다.
- Misclassification test는 미지의 시료를 모델에 추가하여 시료의 화학적 프로파일링에 의해 어느 그룹에 위치하였는가를 도식화 및 확률적인 계산을 통해 보여주는 방법으로 본 연구에서 SIMCA P+ software (SIMCA-P version 16.0, Umetrics)를 이용하여 수행하였다.
- 미지의 시료는 2019년 생산된 위탁연구기관으로부터 제공 받은 시료를 이용하여 수행하였다 (국내산-5점, 국외산-5점).
- 그림 1은 본 연구에서 구축한 원산지 판별 모델 (그림 58A)과 모델시스템에서 미지의 시료 (노란색 점, 하늘색 점)의 위치를 나타내었다 (그림 58B). 미지 시료 1점을 제외하고 미지 시료-국내산은 원산지 판별 모델에서 국내산 그룹에 가깝게 위치하고 국내산 그룹으로 그룹화되어 있는 것을 확인하였다. 또다른 미지 시료는 원산지 판별 모델에서 국외산 (미국, 중국) 그룹에 가깝게 위치하고, 국외산 그룹으로 그룹화되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 그림 58C에서 Fisher 'prob (p-value) 값이 $1.2e-29$ 으로 0.01보다 낮은 수준으로 확인되어 위 결

과가 신뢰가 있는 것을 확인하였다. 따라서 본 판별 모델은 미지의 시료의 원산지를 판별할 수 있는 유용한 도구로 추후 원산지 판별 검사에 활용될 수 있을 것으로 사료 된다.

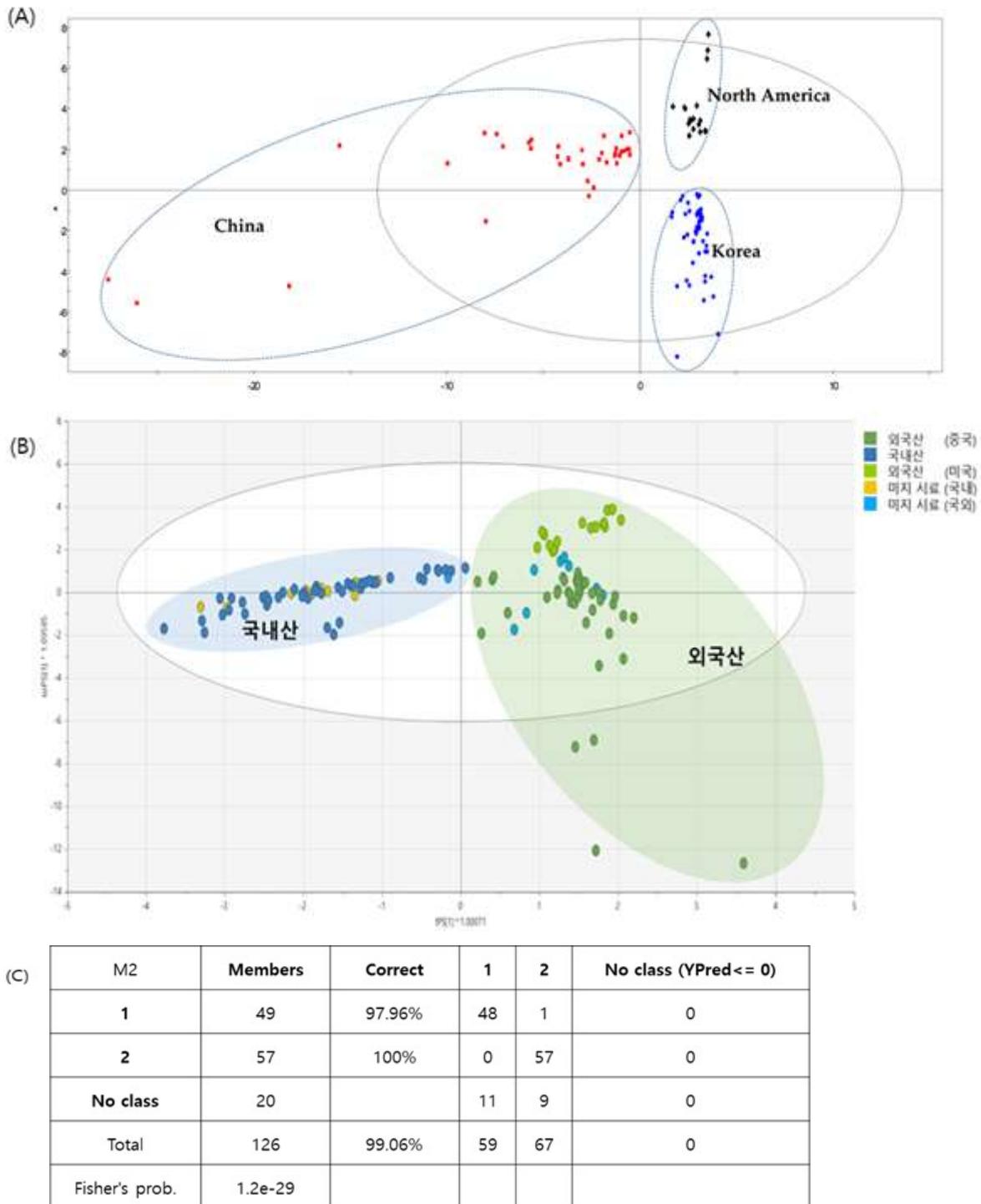


그림 58. Misclassification 테스트를 통해 얻은 미지 시료의 유사성 판별

(9) 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 구축

- NMR, GC-MS, GC-TOF/MS, LC-MS 분석 기기를 통해 농산물 3종 (대두, 참깨, 쌀)에 대해 검출한 대사체 데이터를 취합하여 통합 데이터베이스를 구축하였다.
- 공동연구기관1에서 수행한 pathway analysis를 통해 원산지 구별하는 pathway를 나타내고, 이를 통해 pathway database를 구축하였다 (그림 59A, 59B).

Metabolome Database

database for discrimination of geographical origins

Soybean
Sesame
Rice

Ewha Womans University
Chung-Ang University
Seoul University

ID	Compound	CAS No.
L1	(10E,12E)-9-oxoheptadeca-10,12-dienoic acid	54665-32-6
T1	(1R,2R,4S,5R)-6-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxycyclohexane-1,2,3,4,5-pentol	3687-64-7
T2	(1S,2S,4S,5R)-6-methoxycyclohexane-1,2,3,4,5-pentol	484-68-4
N1	(2E)-but-2-enedioic acid	110-17-8
N2	(2-hydroxyethyl)trimethylazanium	62-49-7
T3	(2R)-2,3-dihydroxypropanoic acid	6000-40-4
T4	(2R)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4R,6R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	21590
T5	(2R)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-one	50-81-7
T6	(2R)-2-[(2S,3S,4R)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]-2-hydroxyacetaldehyde	14122-18-0
T7	(2R)-2-amino-3-sulfanylopropanoic acid	52-90-4
N3	(2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioic acid	87-69-4
T8	(2R,3R,4R,5S)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol	50-70-4
T9	(2R,3R,4S,5R)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol	58-61-7
L2	(2R,3R,4S,5R,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5,6-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)oxan-3-yl]oxyoxane-3,4,5-triol	14641-93-1
L3	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-6-[(2R,3S,4R,5R)-4,5,6-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)oxan-3-yl]oxyoxane-3,4,5-triol / (2S,3R,4S,5R,6R)-2-[(2R,3R,4S,5R,6S)-4,5,6-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)oxan-3-yl]oxyoxane-3,4,5-triol / (2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy]-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	1109-28-0
T10	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy]-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy]-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	470-55-3
N4	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	57-50-1
T11	(2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanoic acid	133-42-6
N6	(2R,3S,4R,5S)-2,3,4,5-tetrahydroxyhexanedioic acid	526-99-8
T12	(2R,3S,4R,5S)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol	608-66-2
T13	(2R,3S,4S,5R)-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolane-2,3,4-triol	53188-23-1
L4	(2R,3S,4S,5R)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol	24557-79-7
T14	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxane-3,4,5-triol	99-20-7
T15	(2R,4R)-pentane-1,2,3,4,5-pentol	488-82-4
T16	(2S)-2-(methylamino)propanoic acid	600-21-5

그림 59A. 통합 데이터베이스

Pathway Database

database for discrimination of geographical origins

Soybean
Sesame
Rice

1 페이지

Ewha Womans University
Chung-Ang University
Seoul University

pathway analysis result

Compound	CAS	formula	rice_pathway	identical method	Other DBs
R1	alanine	56-41-7	C3H7NO2	map 001 Alanine, aspartate and glutamate metabolism map 002 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ES1-positive DB ID: 726, N12 pubchem ID: 5950 KEGG ID: C00049
R2	arginine	7200-25-1	C6H14N4O2	map 002 Aminoacyl-tRNA biosynthesis map 005 Arginine biosynthesis	ES1-positive DB ID: L13 pubchem ID: 6322 KEGG ID: C0051
R3	asparagine	70-47-3	C4H8N2O3	map 001 Alanine, aspartate and glutamate metabolism map 002 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ES1-positive DB ID: T13, N5 pubchem ID: 6267 KEGG ID: C00152
R4	aspartic acid	56-84-8	C4H7NO4	map 001 Alanine, aspartate and glutamate metabolism map 002 Aminoacyl-tRNA biosynthesis map 003 Glycine, serine and threonine metabolism	ES1-positive DB ID: 726, N10 pubchem ID: 5960 KEGG ID: C0040
R5	betaine	107-43-7	C5H11NO2	map 003 Glycine, serine and threonine metabolism	ES1-positive DB ID: L9 pubchem ID: 247 KEGG ID: C00719
R6	choline	62-49-7	C5H14NO	map 003 Glycine, serine and threonine metabolism	ES1-positive DB ID: L11 pubchem ID: 5950 KEGG ID: C00114
R7	citrulline	372-75-8	C6H13N3O3	map 005 Arginine biosynthesis	ES1-positive DB ID: T25 pubchem ID: 9750 KEGG ID: C00327
R8	cysteine	52-90-4	C3H7NO2S	map 002 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ES1-positive DB ID: T4 pubchem ID: 5862 KEGG ID: C00087
R9	fumaric acid	110-17-8	C4H4O4	map 005 Arginine biosynthesis	ES1-positive DB ID: N1, T52 pubchem ID: 444972 KEGG ID: C00122
R1	glucose	3280-44-5	C6H12O6	map 004 Galactose metabolism	ES1-positive DB ID: ID: 742 pubchem ID: 5793 KEGG ID: C00267
R1	lactose 6-phosphate	56-73-5	C6H13O9P	map 004 Galactose metabolism	ES1-positive DB ID: T56 pubchem ID: 438958

그림 59B. pathway database

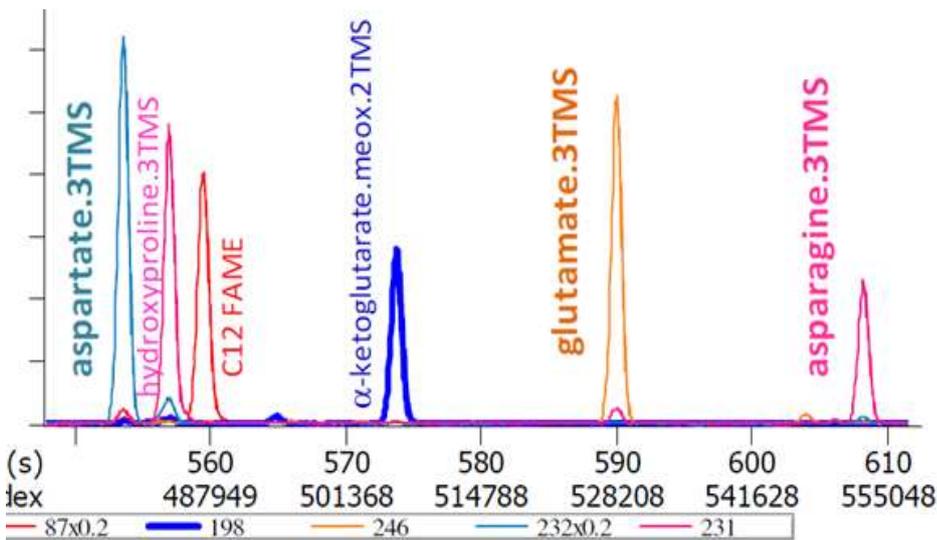
나. 공동연구기관 1: 서울대학교 식품·동물생명공학부 식품생명공학전공 이도엽 교수

(1) GC-TOF MS 비표적 프로파일링을 통한 대두 일차대사산물 대사체 정보획득

(가) 기체 이온화 질량분석 (GC-TOF) 시스템을 이용한 초고속 다중 질량분석 시스템 최적화

① 휘발성 대사산물을 제외한 기초대사산물 프로파일링:

② 주요 일차대사산물의 질량분석시스템의 감도 향상을 위한 유도체화 방법 (derivatization method) 확립



- 추출된 화합물중 주요기초대사산물의 화합물 구조를 안정화하고 또한 분석을 위하여 사용된 gas-chromatography coupled time-of-flight MS상에서의 높은 sensitivity를 유지하기 위하여 유도체화 방법을 적용하였다. 이중 가장 다양한 화합물에 적용할 수 있는 MSTFA를 활성수소 치환기 (silylation)로 사용하였다.

- Carbonyl group의 oxime 유도체화를 통하여 환원당의 recyclization을 방지하고, decarboxylation으로 생성된 화합물의 carbonyl group protection을 위하여 methoxiamine을 pyridine 용매에 용해시켜 사용하였고, 최적화된 reaction volume과 reaction time 및 두 용매 시스템간의 비율을 정립하였다 (1st derivatization: 5ul for 90 min, 2nd derivatization: 45ul for 60 min).

④ 기체크로마토그래피 기기조건 최적화 (칼럼 선정, 인젝터 온도, 오븐 온도 프로그래밍)

- 기초대사산물의 주 분석장비로, 재현성, 감도등이 우수하며 시스템 운용의 안정성을 확보하기 용이한 기체크로마토그래피 분리방법 (gas- chromatographical separation)의 고속정밀분석의 최적화를 위하여 0.25 μ m 95% dimethyl 5% diphenyl polysiloxane film로 코팅된 30 m, 0.25 mm i.d. Rtx-5Sil MS column을 사용하였으며, 구체적인 gas chromatography의 parameter를 최적화하였다.

㉔ 고성능 다중 질량분석 기기조건 정립 (스캔속도, 질량스캔시작점, collision energy 최적화)
 - 질량분석의 주 시스템으로 사용되고 있는 time-of-flight (TOF) 질량분석 시스템 (mass spectrometer)의 parameterization을 통하여 microalgae의 대사체 분석에 최적화를 달성했으며, 구체적인 parameter는 아래의 그림에 명시되어 있다. 예를 들어 high-throughput과 sensitivity의 최적 스캔속도는 17 scans/sec, acquisition delay는 350 sec, detector voltage 1750~1800, ion source temperature 250 C등의 주요 parameter의 최적화 작업을 마쳤다.

㉕ 대두시료 최종대사산물의 정성적 분석을 통한 DB 구축

㉖ 대사체 프로파일링 후 Fiehn library, NIST library 연계된 Binbase 프로그램을 통한 대사체 동정

- 1차년도 현 보고서 작성시점까지 약 100여개의 대사체가 동정되었으며, 아직 동정되지는 않았지만 unique feature로 분류된 putative chemical이 약 350종에 이른다. 1차 동정된 chemical은 glycolysis, fatty acid metabolism, TCA cycle, amino acid metabolism등 다양한 primary metabolism의 intermediate에 해당, 이 library를 이용한 동정자동화 공정에 의해 추후 진행될 연구의 중요한 database로 적용가능하다.

Chemical Class	Number	Percentage (%)
Amino acids	27	25.5
Amines	4	3.8
Nucleosides	10	9.4
Carbohydrates	26	24.5
Fatty acids	13	12.3
Carboxylic acid	16	15.1
etc	28	26.4

표 36. 대두 지역별 비휘발성 일차대사산물 분석(pilot study)

Average Rt(min)	Average RI	Q u a n t mass	Metabolite name	Abundance (Intensity)			
				전남_강진	강원_양구	경북_영주	Unknown
10.8	651503.44	144	1,2-anhydro-myo-inositol	938	14	346	1741
9.55	551893.62	129	1,2-cyclohexanedione	36103	14429	0	3809
10.58	634045.62	147	1,5-anhydroglucitol	23108	13552	14799	15978
17	1122938.88	217	1-kestose	1262538	30556	3918039	3812097
14.52	952855.06	147	1-monoolein	2503727	2291747	518362	2096792
13.86	899458.19	103	1-monopalmitin	32013	46028	46880	24371
14.6	959290.12	211	1-monostearin	305	890	229	273
8.86	495452.31	263	2,6-ditert.butylphenol	8392	7513	9123	7743
7.13	355002.06	117	2-deoxyerythritol	2587	4033	4959	2565
8.09	432883.38	147	2-deoxytetric acid	84329	91790	64429	80483
8.99	506429.38	129	2-hydroxyglutaric acid	90592	28942	50808	58932
5.33	206194.31	152	2-hydroxypyridine	40818	14467	26918	30003
6.59	310586.09	176	2-hydroxyvaleric acid	293	7	483	14
5.56	224770.11	89	2-ketobutyric acid	731	3880	4337	2293
8.38	456804.66	147	2-ketoglucosedimethylacetal	40764	30287	7557	30111
14.39	942048	103	2-monoolein	567	11770	1620	6351
9.17	520926.38	147	3 hydroxy-3-methylglutaric acid	32300	43070	20058	23034
8.32	452070.75	174	3-aminoisobutyric acid	19805	207	46793	1332
12.31	773620.75	147	3-hydroxypalmitic acid	550245	697589	581083	603702
6.16	274940.5	152	3-hydroxypyridine	2377	2214	2281	1513
14.87	980665.25	103	4',5-dihydroxy-7-glucosyloxyflavone	3321	57914	17539	17318
8.77	488244.88	174	4-aminobutyric acid minor	1513445	181170	4615282	183633
6.76	325016.22	147	4-hydroxybutyric acid	20794	22292	26031	5397
9.36	536122.69	129	5-aminovaleric acid	9813	380	11373	9858
14.7	967001.94	169	5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	351	313	375	434
8.84	494490.56	142	5-hydroxynorvaline	10827	8827	33199	5398
13.42	863713.38	174	5-methoxytryptamine	1720	4899	1507	2610
13.53	872262.25	259	5-methyluridine	2596	3100	1311	2344
5.38	209951	123	6-chlorohexanol	37169	36705	28048	34636
10	587352.5	147	aconitic acid	149872	173059	245171	122154
10.74	646775.12	264	adenine	4574	26844	2099	16013
15.62	1038342.38	169	adenosine-5-monophosphate	13920	4544	9071	5354
5.79	244298.16	116	alanine	3141890	764690	16072160	1005606
10.76	648512.69	100	allantoic acid (dehydrated) 4TMS major	19231	9428	115140	7965
9.82	573452.38	147	alpha-aminoadipic acid	36378	3328	49009	18002
9	507474.09	89	alpha-ketoglutarate	23217	3217	4501	7596

8.36	455155.41	218	aminomalona	17768	4906	33877	3344
11.1	675656.62	94	ascorbic acid	1208	2785	3061	3186
9.58	553760.62	116	asparagine	964715	34688	2032955	759261
8.61	475740.22	100	asparagine dehydrated	912321	26373	1981363	421530
8.67	480361.16	232	aspartic acid	1237931	865533	5975652	206494
6.94	339115.72	105	benzoic acid	43400	25925	71291	17610
8.11	434903.62	174	beta-alanine	1537362	102547	4397396	120265
14.8	974766.62	204	beta-gentiobiose minor	8705826	8493453	7499338	8791875
9.85	575405.38	243	beta-glycerolphosphate	5132	5994	6718	4446
17.06	1126513.62	129	beta-sitosterol	157145	73731	44391	51729
6.19	277468.06	142	butyrolactam	13822	5088	32705	5127
8.31	451138.44	103	capric acid	3559	1093	6561	1279
15.53	1032085.06	117	cerotinic aci	5233	5784	4531	5687
11.63	718496.12	338	cis-sinapinic acid	6344	5240	3908	5413
7.57	391061	117	citraconic acid	338	7547	9056	355
10.4	619729.12	147	citric acid	1271520	678459	5936786	7242742
11.1	676141.56	147	conduritol-beta-epoxide minor	579842	708311	837217	748314
7.73	403896.59	141	cyanoalanine	15164	980	25564	15315
8.91	499472.66	147	cysteine	6998	0	5842	513
15.27	1012154.25	398	daidzein	2100	18486	5843	5344
10.69	642799.12	205	dehydroascorbic acid	3834	8456	12787	6385
15.09	997776.88	208	delta-tocopherol	47605	71545	48979	26492
16.75	1108655.75	91	deoxycholic acid	36865	1231	25497	29807
11.22	685894.38	149	dibutyl phthalate	11408	1530	15083	10861
14.95	987280.5	156	digalacturonicacid	7937	4648	14440	6570
10.04	591048.62	217	diglycerol	37542	10284	7	1
8.22	444168.81	93	dihydroxymalonicacid	290	196	32	373
5.68	234966.91	92	enolpyruvate	286	357	0	291
8.56	471359.53	147	erythritol	16284	21165	20087	21457
9.05	510775.88	147	erythronic acid	73164	14648	125774	300789
7.01	344852.19	174	ethanolamine	357800	738733	482629	229139
11.83	734579.44	86	ferulic acid	478	667	921	415
10.65	639441.31	103	fructose	214202	306376	363321	261725
9.87	577157.31	117	fucose	13952	1801	17444	9271
7.57	390925	147	fumaric acid	84282	56148	65335	73833
15.09	998275.75	204	galactinol	8065	5799	7060	25439
11.3	691668.38	147	galactonic acid	298968	449618	132106	258155
10.75	648078.31	147	galactose	48987	27286	147796	29096
12.96	826097.38	217	galactose-6-phosphate	29038	19157	17566	20427
11.14	679403.06	147	galacturonicacid	166617	402490	599985	245963
7.25	364701.69	102	gamma-aminobutyric acid 2TMS	17013	2491	34203	3216

12.98	827927.81	147	glucoheptulose	447027	217086	326729	236526
11.32	693593.62	147	gluconic acid	186260	598138	176323	439520
10.79	650851.81	147	glucose	128123	218922	8949	7298
10.09	595262.5	217	glucose-1-phosphate	23845	5606	18354	15865
12.84	816457.56	147	glucose-6-phosphate minor	176083	362701	160283	179897
9.27	529082.38	246	glutamic acid	615656	246823	2592064	291859
10.16	600796.12	156	glutamine	13184	5334	40366	4434
7.94	421385.19	140	glutaric acid	317	957	308	106
7.41	377565.19	147	glyceric acid	29836	49778	41511	37012
7.01	345303.75	147	glycerol	464351	810357	498834	513599
12.7	804979.88	204	glycerol-3-galactoside	68938	7369	81231	6352
10.05	592018.69	299	glycerol-alpha-phosphate	69313	45280	100055	43022
7.29	368222.03	174	glycine	1164769	267062	3770253	226684
5.59	227418.84	173	glycolic acid	1794	2480	1550	1861
12.04	751530	117	heptadecanoic acid	5448	5919	5315	6021
9.22	525131.38	85	hexadecane	7821	6288	1777	4195
11.45	704379.69	217	hexitol	614	332	2093	1927
13.03	831538.31	204	hexose-6-phosphate	4630	102956	9205	38858
10.58	634234.94	204	hexoside	13069	6415	9128	12090
10.96	664399.06	154	histidine	464802	23166	1087028	121040
8.22	443558.12	220	homoserine	571	104	1505	47
5.91	254304.53	133	hydroxylamine	7811	5502	8401	3769
5.34	206644.41	152	hydroxypyridine	1067	55788	17931	344
13.84	897901.25	217	inosine	62122	39585	41018	99928
13.19	845302.06	147	inositol-4-monophosphate	82653	92534	70296	56330
17.15	1131779.25	362	inulotriose	3313	7326	28248	16197
10.41	620297.12	147	isocitric acid minor	2299662	4074217	7370108	4144983
11.34	695201	100	isogluconic acid	578	904	714	238
11.4	699739.25	205	isohexonic acid	11696	980	16151	80204
7.18	359242.56	158	isoleucine	163769	139092	184670	143403
14.91	983516.31	103	isomaltose	10556	0	1809	432
15.02	992086.75	204	isomer1	13444	5907	19694	16235
8.88	497786	85	isothreonicacid	1168	1278	2528	315
7.52	386624.06	147	itaconic acid	49377	67563	73605	63291
14.52	952754.88	204	lactobionic acid	8091020	8324384	5770995	8369118
9.5	547353.25	117	lauric acid	2585	7571	2035	6042
7.03	346528.62	158	leucine	129778	182549	268963	156194
13.69	885938.31	204	leucrose	9554	8060	5995	5802
9.78	569657.19	204	levoglucosan	6631	11631	10295	8736
12.36	777636.5	129	linoleic acid	83975	259724	101307	128074
12.39	780067.12	93	linolenic acid	14866	43513	14819	22855

16.64	1102460.12	129	lithocholic acid	29169	64611	32352	40206
10.95	663574.44	156	lysine	73307	52943	85000	62210
9.84	575120.81	147	lyxitol	22133	30851	4476	7448
7.26	365233.69	147	maleic acid	40855	66339	45049	58228
5.8	245377.23	154	maleimide	8256	2981	6315	3947
8.46	463049.16	147	malic acid	4815722	1199973	690149	4898544
6.55	307262.12	147	malonic acid	130468	368627	17841	37542
14.46	948142.69	103	maltose	0	6185	7561	2617
18.66	1219450.75	204	maltotriitol	238464	252085	110523	222449
10.97	665541.31	103	mannitol	107557	61822	5446	48868
12.92	822793.06	147	mannose-6-phosphate	50310	49114	33243	35683
17.4	1146287.88	133	melezitose	5399	2248	4871	627
14.97	988438.38	204	melibiose minor	43395	88952	26856	23364
6.35	290884.94	241	methanolphosphate	32810	24118	22418	24057
8.7	482890.31	128	methionine	87933	20100	161316	34125
10.63	638472.38	128	methionine sulfoxide	8143	5377	18103	8858
7.9	418071.91	116	methylmaleic acid	2869	1022	12543	982
11.53	710329.38	147	mucic acid	186511	198765	239140	209926
11.77	730195.25	147	myo-inositol	1068034	672643	732004	604041
10.59	635014.5	117	myristic acid	27747	26771	22874	24309
11.7	724251.75	147	N-acetyl-D-galactosamine	31586	4657	7996	2890
11.85	736545.44	205	N-acetylmannosamine minor	2538	2676	1306	1703
10.31	612210.62	147	N-carbamoylaspartate minor	8931	3861	73455	2837
13.86	899356.75	186	nicotianamine	171866	113668	77891	128385
7.27	366456.06	180	nicotinic acid	58727	41337	48400	40492
6.31	287197.44	130	N-methylalanine	47327	11437	134200	14248
7.36	373623.31	158	norleucine	875	191	4594	466
12.09	755570.19	103	octadecanol	3936	2574	3333	1699
5.8	244730.97	187	octanol	2472	440	1237	3042
13.22	847495.81	131	oleamide	5116	3653	7234	3855
12.38	779121.81	117	oleic acid	60697	22048	42404	58953
11.15	679849.06	147	ononitol	674071	499055	617027	255492
9.25	527300.38	142	ornithine 3TMS	669893	92590	1171029	471497
8.73	485627.16	156	oxoproline	985544	530159	3221383	694709
15.06	995366.88	204	palatinitol	5327	7579	6461	3548
11.58	714370.12	117	palmitic acid	1110144	1368739	970536	1078996
7.67	398711.41	117	pelargonic acid	5250	5417	10621	4964
9.7	563917.5	147	pentitol	93140	64596	77431	87100
10.08	593729.88	147	pentonic acid	45431	26213	37515	16831
9.37	537063.19	218	phenylalanine	92063	94099	110824	126484
7.02	345851.22	299	phosphate	5933995	4112145	3813038	3311704

10.21	604439.88	100	phosphoethanolamine	53915	44114	54306	31774
10.48	625910.38	93	pinitol	7655	9649	0	15196
7.72	402757.5	156	pipecolic acid	25089	4327	14469	6130
7.25	364367.81	142	proline	396949	150262	1869109	195919
5.45	215646.62	147	propane-1,3-diol	64378	9325	33769	1096
12.81	814374.5	217	pseudo uridine	2308	2572	6185	1187
10.01	588439.75	174	putrescine	39820	12080	46837	37277
6.8	328422.59	110	pyrophosphate meox	16705	5450	6420	3508
5.39	211335.95	174	pyruvic acid	2412	2058	1734	1808
16.98	1122073.25	217	raffinose	3349059	335297	810	1585134
9.85	575773.75	147	ribitol	17416	16223	50668	29238
10.16	600506.38	147	ribonic acid	39261	67695	54073	29489
11.83	734747.5	249	ribose-5-phosphate	111	17407	1	1
11.39	699320.5	147	saccharic acid	912438	2032236	1165575	1883091
7.62	394869.09	204	serine	614618	49171	1921784	61848
10.32	613112.88	204	shikimic acid	26193	19208	52524	2732
12.5	788443.62	338	sinapinic acid	24030	25707	17149	18709
14.8	975245.56	92	sophorose	2376	2309	2477	2255
11	667664.25	147	sorbitol	239419	1159812	357996	689963
12.54	792279.44	144	spermidine	4871	12548	4567	7460
12.49	787835.38	117	stearic acid	857873	919436	734340	817595
16.75	1108631.5	129	stigmaterol	76530	64864	16700	25144
7.33	370950.75	147	succinic acid	240962	162350	169401	320745
14.05	914974.94	217	sucrose	2721619	2663554	2921170	2835327
15.38	1020397.31	271	sucrose-6-phosphate	3235	4169	4963	9079
6.29	285795.19	114	sulfuric acid	591	1137	322	1
9.6	555504.38	320	taurine	1614	208	0	139
13.18	843916.94	85	tetracosane	7445	0	0	6590
8.51	467095.28	147	threitol	13656	8019	27315	15543
8.88	497206.84	147	threonic acid	45610	144599	198009	109925
7.79	409098.31	117	threonine	204057	26088	361580	38251
8.26	446882.53	147	threose	6928	2983	22628	28227
16.01	1065918.88	237	tocopherol alpha	1303	575	121	420
15.4	1021910.31	223	tocopherolbeta	2073	1842	2198	2002
15.45	1025404.75	223	tocopherol gamma-	63421	48564	30392	17127
8.41	459424.91	158	trans-4-hydroxy-L-proline minor1	423	670	494	397
14.48	949212.81	169	trehalose	1583	0	1774	972
8.57	472289.97	200	tris(ethylenglycol)	106	696	615	153
18.76	1225308.25	204	trisaccharide	61217	67996	30823	72971
12.4	780455.38	202	tryptophan 3TMS	5282801	3366408	1798272	1222873
11.04	671409.25	218	tyrosine	99534	88840	165762	126267

10.51	628733.5	103	UDP GlcNAc	5090	1315	2594	1894
10.48	625793.38	116	UDP-N-acetylglucosamine	164841	171701	193124	156196
7.5	385485.19	99	uracil	4241	22265	4643	7278
6.84	331730.81	171	urea	2846	2195	6220	2254
13.33	856497.94	169	uridine minor	4882	10369	6787	5919
6.63	313858.06	144	valine	322940	281309	363352	205657
10.14	598957.25	297	vanillic acid	13282	21565	16640	16549
9.74	567200.81	103	xylitol	43421	18318	66324	34944
10.02	589671.81	103	xylonic acid isomer	22601	69004	89608	86644
9.49	546531.12	103	xylose	18733	7812	16649	5136

(2) 이차대사산물 고속 확보방법 최적화

(가) 최종 대사산물 추출방법 및 삼상 추출용매 비율 최적화 및 극성에 따른 분획 후 추출방법과 교차비교 후 추출방법 구축

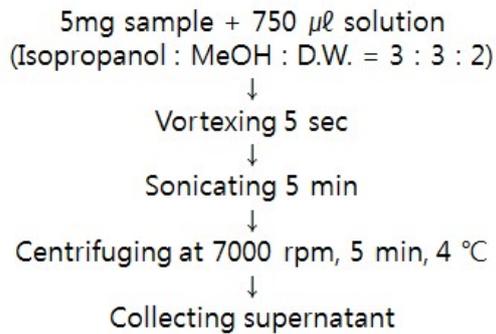
- 연구 수행 방법

- 대사체 추출방법 및 추출용매 최적화: 대사체는 유전체나 단백질체와는 달리 물질별로 상이한 물리화학적(physio-chemical) 특성을 갖고 있으므로, 효과적인 대사체의 추출을 위해서는 추출방법 및 추출용매의 조성의 최적화가 매우 중요하다. 그러므로 다양한 극성을 띠는 물질의 효과적인 추출을 위해서 물, 메탄올, isopropanol, acetonitrile, chloroform 등의 다중 용매 조성의 테스트를 통한 가장 효과적인 추출용매 조성(extraction solvent system)을 확립하고 이는 수율(recovery), 재현성(reproducibility), 다양성(coverage), 감도(peak intensity) 등의 다양한 평가 지표를 통해 최종 평가를 수행하였다.
- 화학적 세포파쇄와 동시에 물리적 힘에 의한 세포파쇄 방법이 요구되며, 대표적인 방법으로 bead beating의 방법을 들 수 있다. 본 연구실은 다양한 진핵세포의 가장 효율적인 대사체 또는 단백질의 획득방법을 다년간 연구해 왔으며 그중, 세포를 동결 건조하여, 이후 stainless steel ball의 높은 밀도와 high frequency homogenization을 이용한 세포파쇄 방법과 접목하여 추출효과를 극대화하였다.

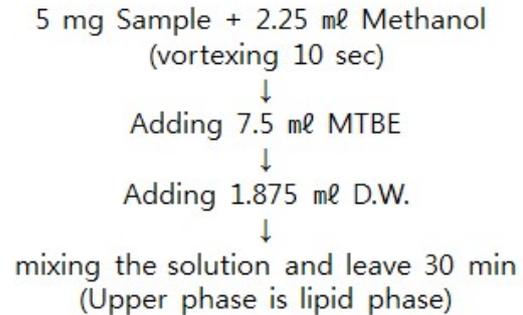
- 연구결과

- 다양한 극성을 띠는 물질의 효과적인 추출을 위해서 물, 메탄올, isopropanol, acetonitrile, chloroform 등의 다중 용매 조성의 테스트를 통한 가장 효과적인 추출용매 조성(extraction solvent system)을 검토하였다. 결과적으로 extraction efficiency와 toxicity를 고려하여 isopropanol:MeOH:H₂O (3:3:2 v:v:v)의 삼상용매를 기본적 extraction solvent로 최종결정하였다.
- 또한 Folch method와 MTBE를 통한 극성에 따른 fractionation 방법이 extraction efficiency에 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단하여, LC-MS analysis를 위한 보완적 추출방법으로 확립하였다.

○ Isopropanol : MeOH : D.W. (3 : 3 : 2)



○ MTBE(methyl tert-butyl ether)



(3) 농산물 시료에 최적화된 액체크로마토그래피 이온 질량분석 시스템 구축

(가) 연구 범위

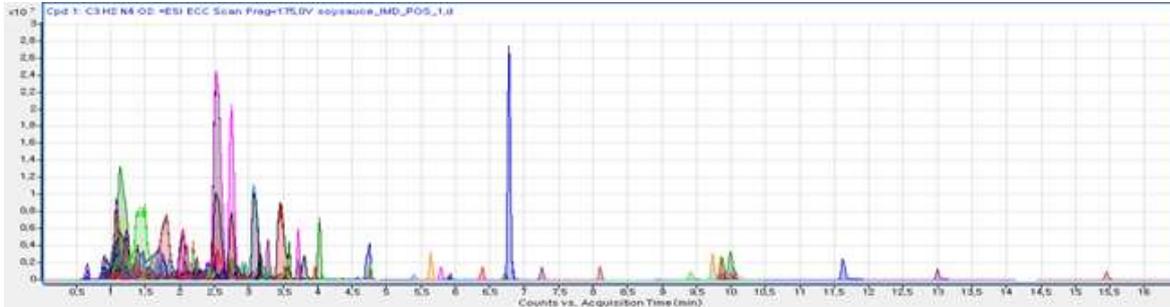
- Reverse phase HPLC 및 hydrophilic interaction liquid chromatography 시스템을 비교 평가하여 Column을 선정하였다.
- Solvent와 reconstitution buffer를 선정하고 gradient 프로그래밍을 통해 액체크로마토그래피 기기조건을 최적화 하였다.
- 스캔속도와 질량 스캔 시작점, collision energy 최적화를 통해 고성능 다중 질량분석 기기조건을 정립하였다.
- 확립된 시료 전처리 조건 및 기기 분석 조건을 이용한 분석법 검증 수행: 검출한계, 직선성, 특이성, 일내·일간 정밀성 (정확성), 안정성 (실온, 장기, 냉해동, 추출후 등)

(나) 연구 수행 방법

- 대두시료에 포함되어 있는 물질 중 GC분석기법으로 검출되지 않는 물질의 검출 및 정량을 위하여 극성물질과 비극성물질의 분석을 위한 액체크로마토그래피 방법의 최적화가 필요하다.
- 이 중 비극성 물질은 reverse phase column을 이용한 liquid chromatography를 수행해야 하며 C18 column이 가장 보편적으로 사용되고 있다.
- 이의 최적화를 위하여 분석시간, 분해능, peak shape, intensity의 비교를 통한 검증을 수행하였으며, 또한 비극성물질의 carry-over를 고려한 LC 조건 및 column을 최종 선정하였다.
- 극성물질을 분석하기 위하여 hydrophilic interaction liquid chromatography 방법을 적용하였으며, 이를 통해 RPLC의 방법으로 분리를 할 수 없는 극성물질들의 retain을 유도하여, 대두에서 검출할 수 있는 대사체의 범위를 확대하였다.
- 이온화 경향에 따라 positive/negative ionization에 모두 사용할 수 있는 용매의 조건을 확립하여 한정된 양의 시료로부터 다양한 대사체 검출을 가능하게 하였다.

(다) 연구 결과

- C18 column을 이용한 비극성물질의 LC-MS 분석을 실시하였으며, total ion chromatogram 및 extracted ion chromatogram을 통해 data quality와 재현성을 확인하였다.



- Molecular feature finding 및 molecular formula matching을 통하여, 약 172개의 putative metabolic feature를 선별했으며, 반복실험을 통하여 재현성을 확인하였다 (%CV 15%).

(4) LC-MS raw data process 개발 및 DB 인프라 구축

(가) 연구 범위

- Raw data process를 최적화하고, 통계분석을 위한 normalization process를 확립하였다.
- 바이오마커 선별 및 발굴을 위한 바이오인포매틱스 기반을 구축하였다.

(나) 연구 수행 방법

- 바이오마커 발굴을 위해 신뢰도 높은 통계분석이 진행되어야 하므로, raw data의 data process를 통한 동정상태 전의 metabolic feature 선별의 정확도가 매우 중요하다.
- 특히 mass spectrum을 기반으로 한 peak detection과 peak alignment process는 m/z window, RT window 및 tolerance등의 변수에 의해 다양한 결과 값을 갖게 된다.
- 또한 peak deconvolution, missing value imputation process에 의해 각 개별적 시료에 존재하는 metabolic feature 상호비교하여 유의성을 확보하였다.
- 이를 위해 SEIVEE를 이용한 데이터 프로세스 parameter를 확립하였다.
- MZmine2를 이용한 데이터 프로세스를 교차검증하였다.

(다) 연구 결과

- Raw data process를 최적화한 결과는 다음 표 37와 같다.

표 37. Raw data process 최적화

구분		설정
Mass scan range (m/z)		100-1,000
RT	Start (min)	2
	Stop (min)	20
Frame time width (min)		2.5
m/z width (ppm)		2,000
Maximum number of frames		m/z max, 10min 설정하여 max-min한 값
Peak intensity threshold	Negative ionization mode	4,000
	Positive ionization mode	200,000

(5) 대두시료의 1, 2차 분석을 통한 원산지별 / 연도별 대사체 유동성 연구

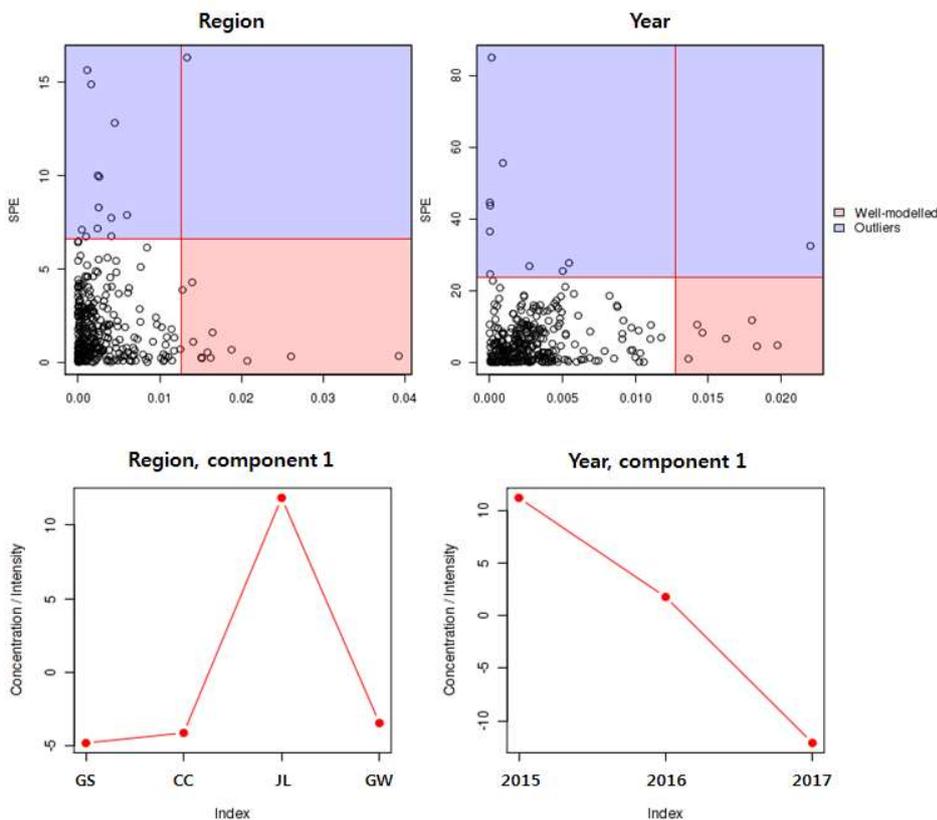
(가) 대두시료의 원산지 1차 2차 연도 데이터 연계분석 및 상호비교.

- 대두시료의 원산지 판별의 신뢰도와 field의 활용성을 높이기 위하여 다년간 획득한 샘플의 포괄적 대사체 유동성 분석을 시행하였다. 이에 2015년도와 2016년도 각 원산지별 대두시료의 대사체 함량을 분석하고, 연도별 강수량, 일조량 등 confounding variable을 일차적으로 선별하여, 당해연도 구축된 원산지 판별 대사체 모델의 최적화를 수행하였다.

(나) 대두시료의 원산지 비특이적 연도 영향인자 발굴 (그림 60).

- 현재 ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA) 분석플랫폼을 구축하였으며, 이를 통한 원산지 특이적 요인 대사체와 연도 특이적 요인 대사체, 그리고 두요소간의 상호작용 대사체로 구분할 수 있는 생물정보학 플랫폼을 구축하였다.

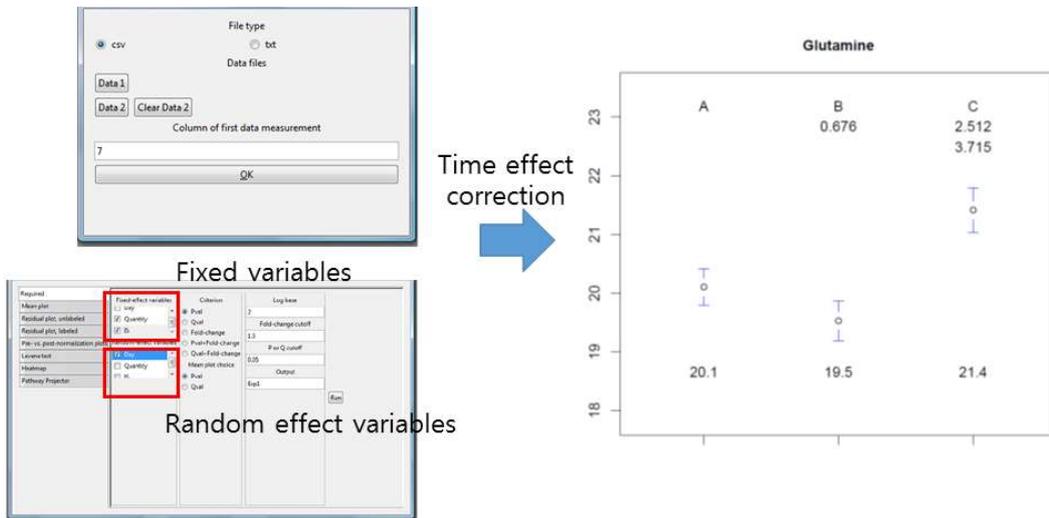
그림 60.



(다) 대두시료의 연도 독립점 대사체 마커 제시 (그림 61).

- 최종적 원산지 판별 인자 선별 및 구축을 위하여, 첫째로 원산지-특이적 연도-독립적 대사체 마커(군) 선별을 시행하고 있으며, 또한 연도요인을 confounding variable correction을 통하여 정성적 대사체 선별모델을 보강한 정량적 대사체 마커군으로 이루어진 모델의 상호비교 후 최종모델 선정 및 선별 대사체군을 검증하였다.

그림 61.



(6) 4개의 도에서 재배된 대두 시료를 동시에 구별할 수 있는 바이오마커 패널을 찾아내기 위해 다양한 통계적 방법을 사용

(가) 단변량 통계 분석 (Univariate statistics) 실시 (표 38)

- Student's T-Test를 이용하여 각 도별로 나머지 3개의 도와 비교했을 때 대사물질들의 변화를 통계적으로 검증하였다.

표 38. 각 도별로 유의 수준 있게 변화하는 대사물질 리스트 (Student's T-Test < 0.05)

Highly abundant in 강원도 compared to others		Highly abundant in 충청도 compared to others	
Metabolite name	Fold change	Metabolite name	Fold change
glucose-6-phosphate	4.800734	pyrophosphate	1.450407
ribitol	2.564154	guanosine	0.772662
galactinol	1.961181	sucrose	0.758288
threonic acid	1.923587	stearic acid	0.754218
myo-inositol	1.898717	oxoproline	0.719887
adenosine-5-monophosphate	1.888786	palmitic acid	0.695774
glycolic acid	1.796546	heptadecanoic acid	0.672905
pyruvic acid	1.748238	isoleucine	0.654567
2-hydroxypyridine	1.696991	nicotinic acid	0.644162

pinitol	1.607928	hexitol	0.64216
3-hydroxypyridine	1.582937	2-deoxyerythritol	0.623255
xylose	1.563528	lyxose	0.621772
enolpyruvate	1.47906	ethanol phosphate	0.614365
propane-1,3-diol	1.46745	methionine sulfoxide	0.607742
methionine sulfoxide	1.430707	isothreonine acid	0.58908
6-chlorohexanol	1.420251	inositol-4-monophosphate	0.578297
sucrose	1.410307	fumaric acid	0.576705
ethanol phosphate	1.379822	3-hydroxypropionic acid	0.519043
valine	1.360442	succinic acid	0.493282
stearic acid	1.295198	ethanolamine	0.484675
nicotinic acid	1.289362	xylose	0.48433
heptadecanoic acid	1.28316	1-monopalmitin	0.482637
tryptophan	1.280354	uracil	0.473167
palmitic acid	1.240286	glucose	0.401236
		fructose	0.400254

Highly abundant in 전라도
compared to others

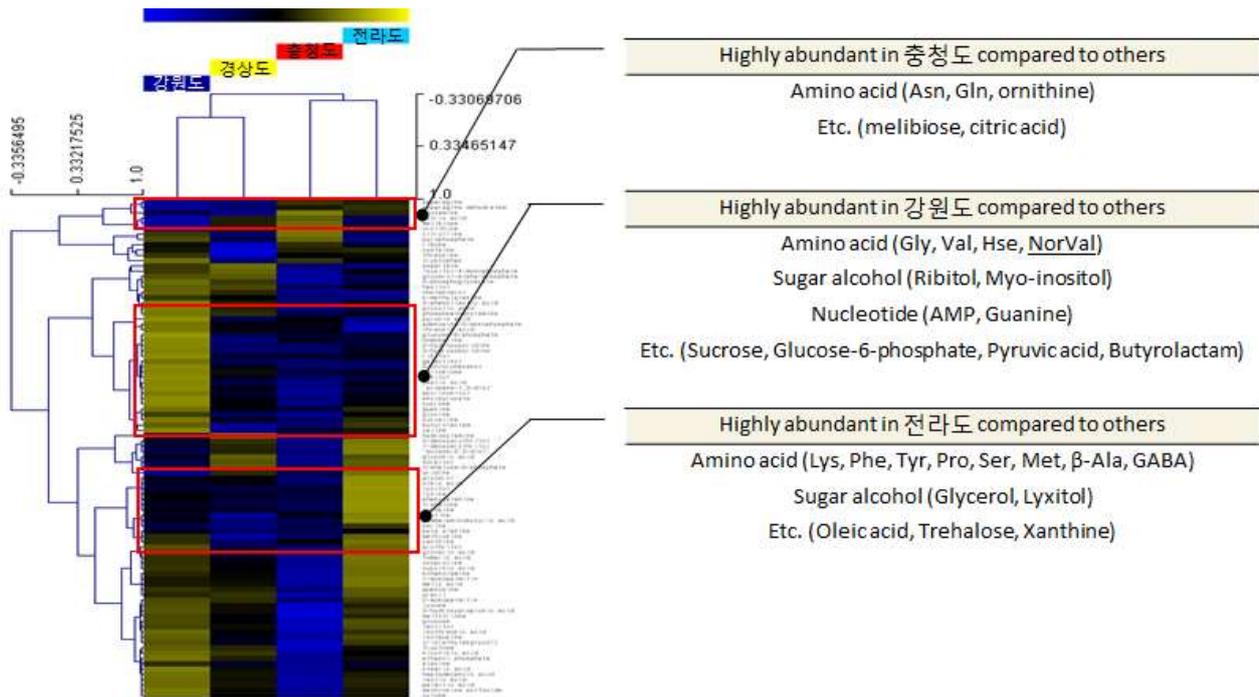
Metabolite name	Fold change
trehalose	4.977569
lyxitol	3.98363
oleic acid	2.73232
glycerol	2.495317
1-deoxyerythritol	2.224129
tyrosine	2.198392
phenylalanine	2.086746
asparagine dehydrated	1.865724
proline	1.800589
lysine	1.663346
1-monopalmitin	1.56195
succinic acid	1.541476
fumaric acid	1.528455
ethanolamine	1.486705
glucose	1.440009
gamma-aminobutyric acid	1.389419
2-deoxyerythritol	1.368375
methionine	1.343611
oxoproline	1.281367
isoleucine	1.218101
pyrophosphate	0.679765
adenosine-5-monophosphate	0.500924
threonine acid	0.427927

Highly abundant in 경상도
compared to others

Metabolite name	Fold change
aspartate	1.506453
glycerol-alpha-phosphate	1.307643
tryptophan	0.787414
valine	0.763704
threonine	0.724208
methionine	0.723646
cysteine	0.652697
proline	0.545446
glutamine	0.379233

(나) HCL에서 Basal expression pattern를 확인 (그림 62).

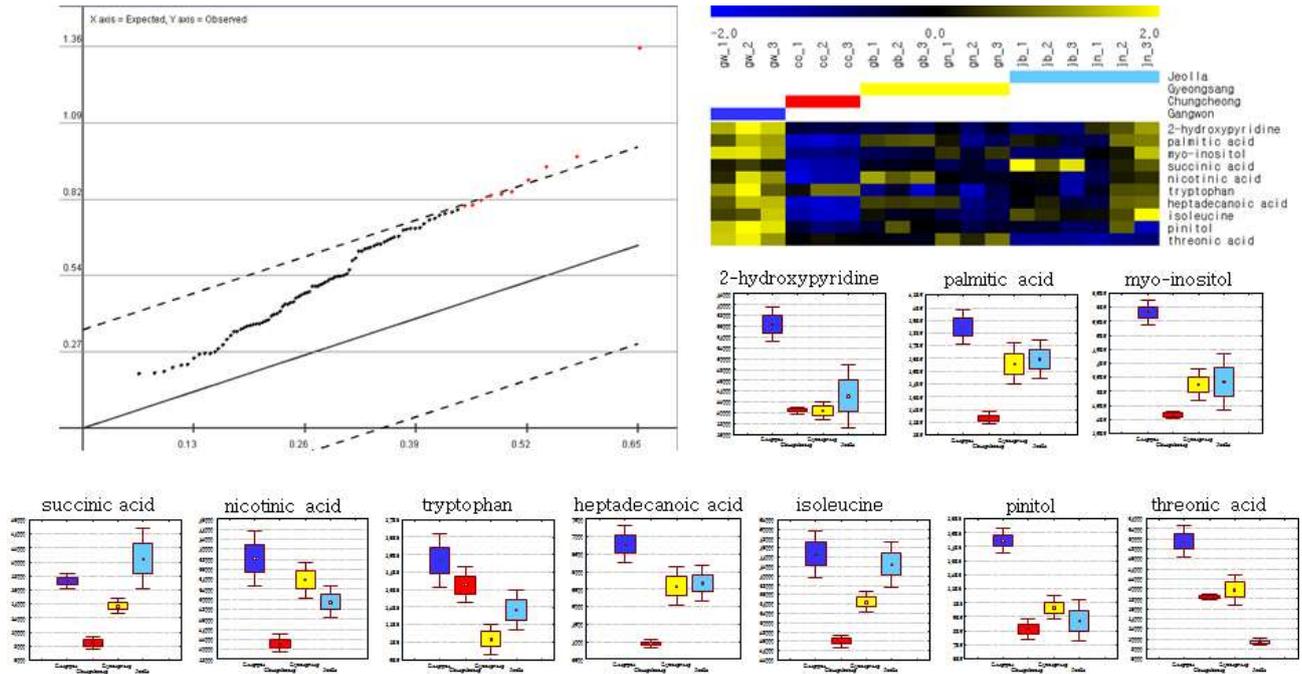
- 전체적인 pattern을 확인했을 때, 대체적으로 각각의 4개의 도에서 다른 3개의 도와 비교하여 Amino acid 계열이 변화한 것을 확인하였다.
- 강원도 지역의 경우 다른 3개의 도와 비교하여 대체적인 대사물질 (Amino acid, Sugar alcohol, Nucleotide 등)의 변화가 큰 것을 확인하였다.
- 전라도의 지역의 경우, 다른 3개의 도와 비교하여 Amino acid의 변화가 큰 것으로 확인하였다.
- 그림 62.



(다) SAM (Significance Analysis for Microarrays) 분석 (그림 63).

- 4개의 도를 같이 비교하였을 때, 10개의 대사 물질 (2-hydroxypyridine, palmitic acid, myo-inositol, succinic acid, nicotinic acid, tryptophan, heptadecanoic acid, isoleucine, pinitol, threonic acid)이 각 도별 특징을 보여주었다.
- 대체적으로 강원도는 나머지 3개의 도에 비해 up regulated 되었으며, 충청도 지역이 down regulated 된 것을 확인 할 수 있었다.

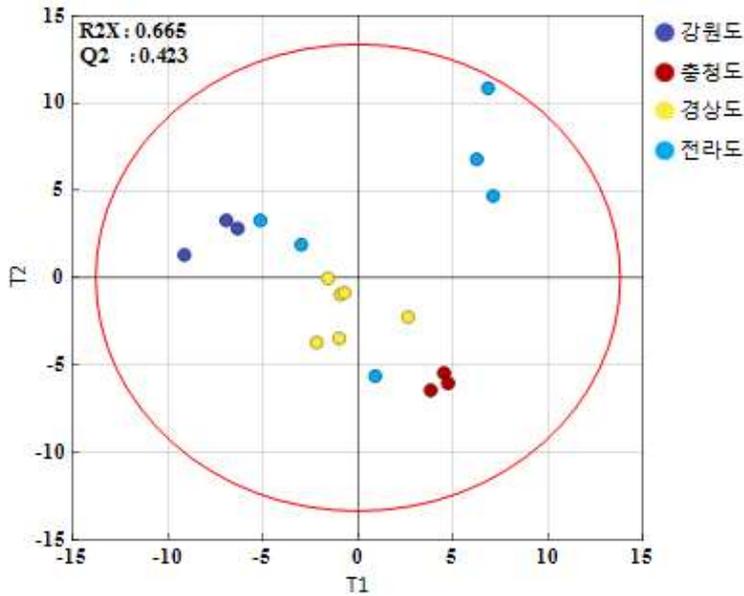
그림 63.



(라) Unsupervised multivariate statistics (그림 64).

- 주성분분석 (PCA)를 이용하여 분석 한 결과, 국내 4개의 도에서 재배되는 대두시료에서 검출된 대사체들의 차이를 확인할 수 있었다.

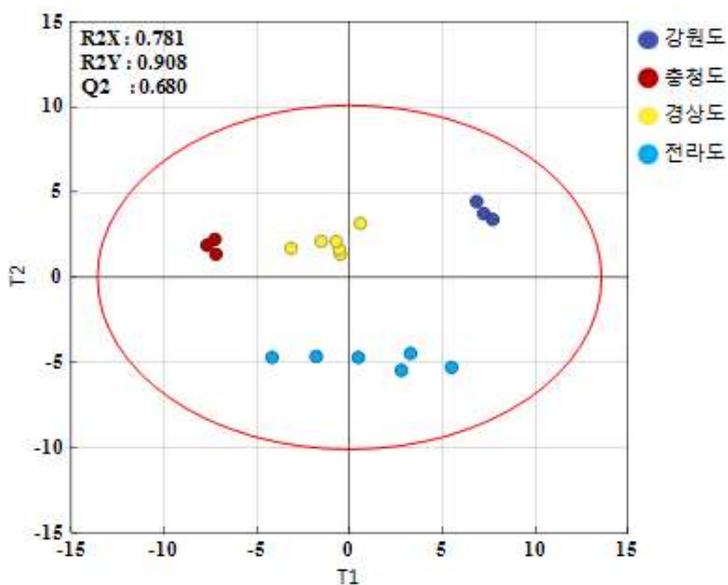
그림 64.



(마) Supervised multivariate statistics (그림 65).

- 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 적용하였을 때, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었으며 ($R^2Y = 0.908$, $Q^2 = 0.680$), 그룹 정보와 관련이 없다고 여겨지는 인자를 모두 y 벡터에 위치시킴으로써 주성분분석 (PCA)과 비교하여 더욱 향상된 그룹간의 구별을 확인할 수 있었다.

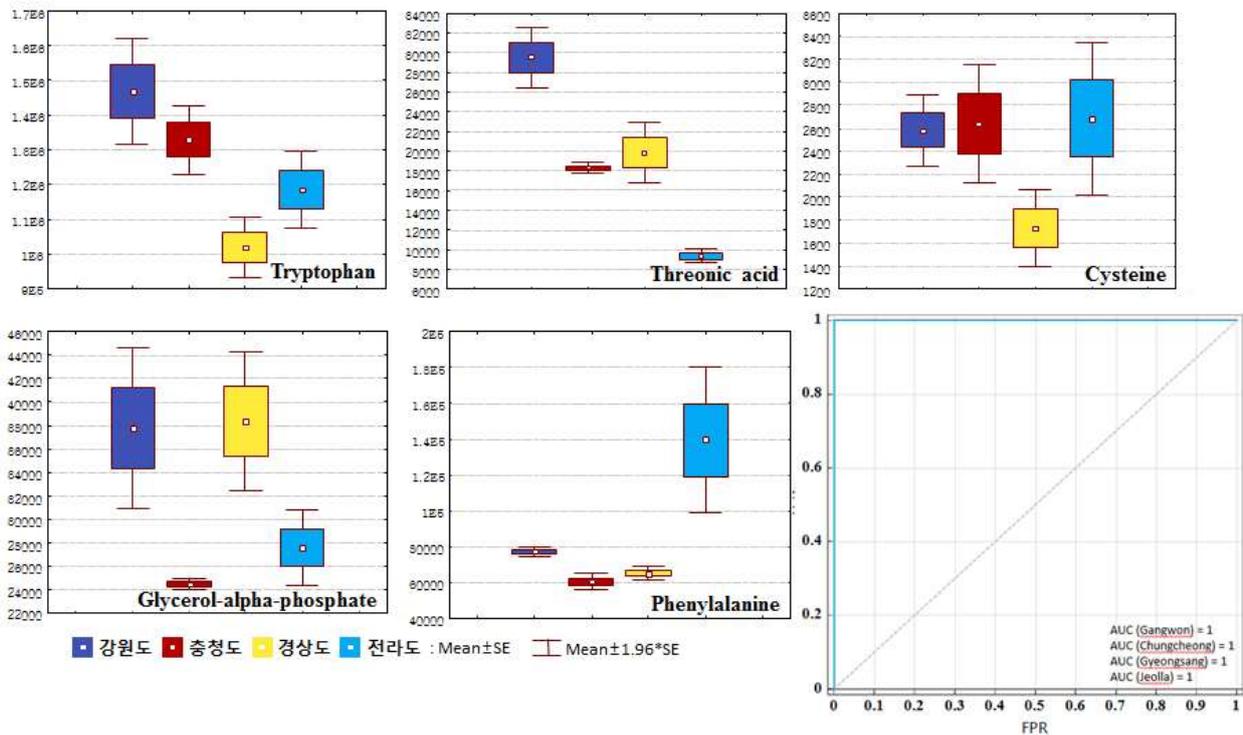
그림 65.



(바) Receiver operating characteristic (ROC) Curve analysis (그림 66)

- 바이오마커 후보 대사물질을 스크리닝 하기위해 다양한 통계적 방법을 사용하였고, 이에 VIP score 순위나 교집합, 여집합의 개념을 도입하여 여러 가지 대사물질들의 조합을 만들어 생체 지표로써의 기능성을 평가하였다.
- 다양한 테스트를 거친 결과 OPLS-DA 모델에서의 VIP가 높은 대사물질들의 조합이 4개의 도를 가장 잘 구별해 주는 것을 확인하였고, 따라서 이에 집중적으로 바이오마커 composite을 최적화하였다. VIP score가 높은 대사물질부터 차례대로 수를 늘려가며 조합을 만들어 ROC Curve analysis를 한 결과 5개의 대사물질의 구성이 가장 좋은 AUC Value를 나타내었다. 최종적으로 선택된 5개의 대사물질은 Tryptophan, Threonic acid, Cysteine, Glycerol-alpha-phosphate, Phenylalanine으로 구성되어 있으며 이들 조합의 AUC value는 강원도-others, 충청도-others, 경상도-others, 전라도-others 모두 1이다.

그림 66.



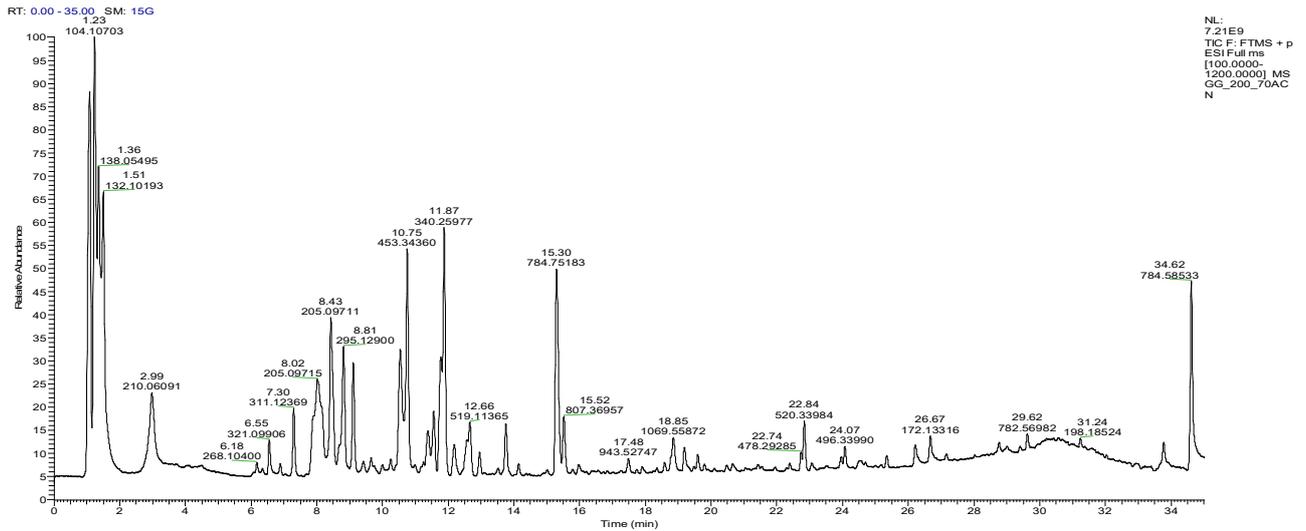
(7) LC - Orbitrap MS 비표적 프로파일링을 통한 대두 이차대사산물 대사체 정보 획득

(가) 고감도 high-resolution mass spectrometer인 Orbitrap MS를 이용한 표적/비표적 대사 프로파일링을 획득하였다.

- 이를 위해 대두시료에 포함된 다양한 이차대사산물의 검출 목표를 위하여 보편적인 reverse phase liquid chromatography를 적용하였으며, C18 column chemistry는 그 robustness, reproducibility에 있어서 우수한 성능을 가지고 있으며, 최소화된 carry-over의 특징을 가지고 있어 high-throughput analysis에 적합함을 확인하였다.

- 또한 기존논문 검색을 통해 대표적 이차대사산물 및 기능성 대사산물의 리스트를 통한 표적 물질 프로파일링 플랫폼을 구축하였으며, 대부분의 해당 물질의 양이온화 성질을 고려하여, ionization method 및 구체적 질량분석 parameter를 optimization 하였다.
- 이를 통해 우수한 분리능, 검출범위를 갖는 최종적인 분석방법을 구축하였으며, 표적/비표적 대사물질 프로파일링을 통한 본 시료 분석을 수행 완료하였으며, 현재 데이터 프로세스를 진행 중이다.

(a)



(b)

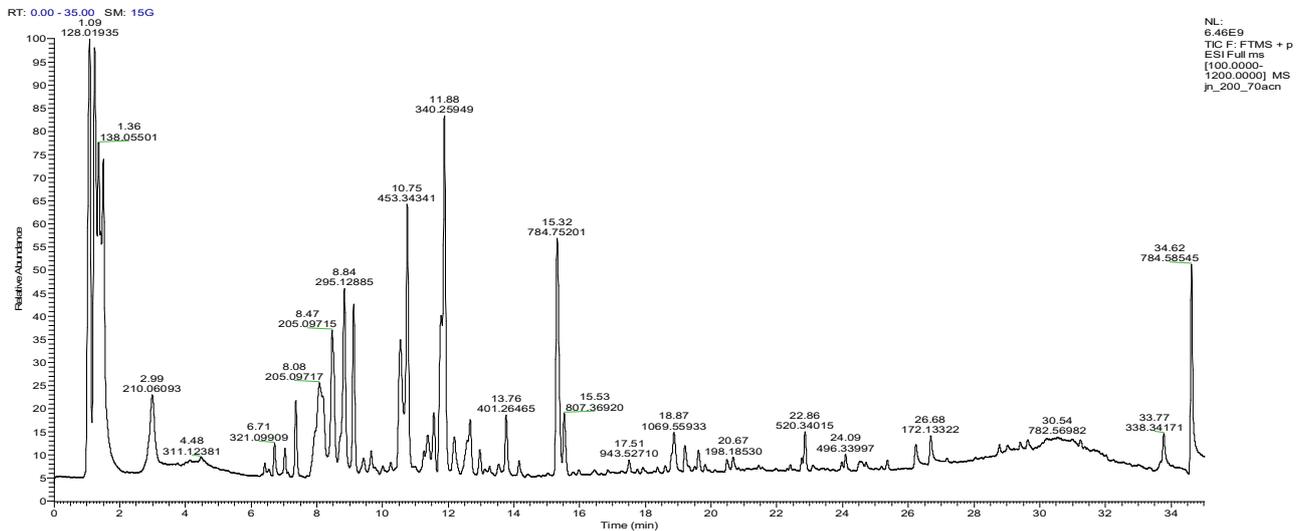
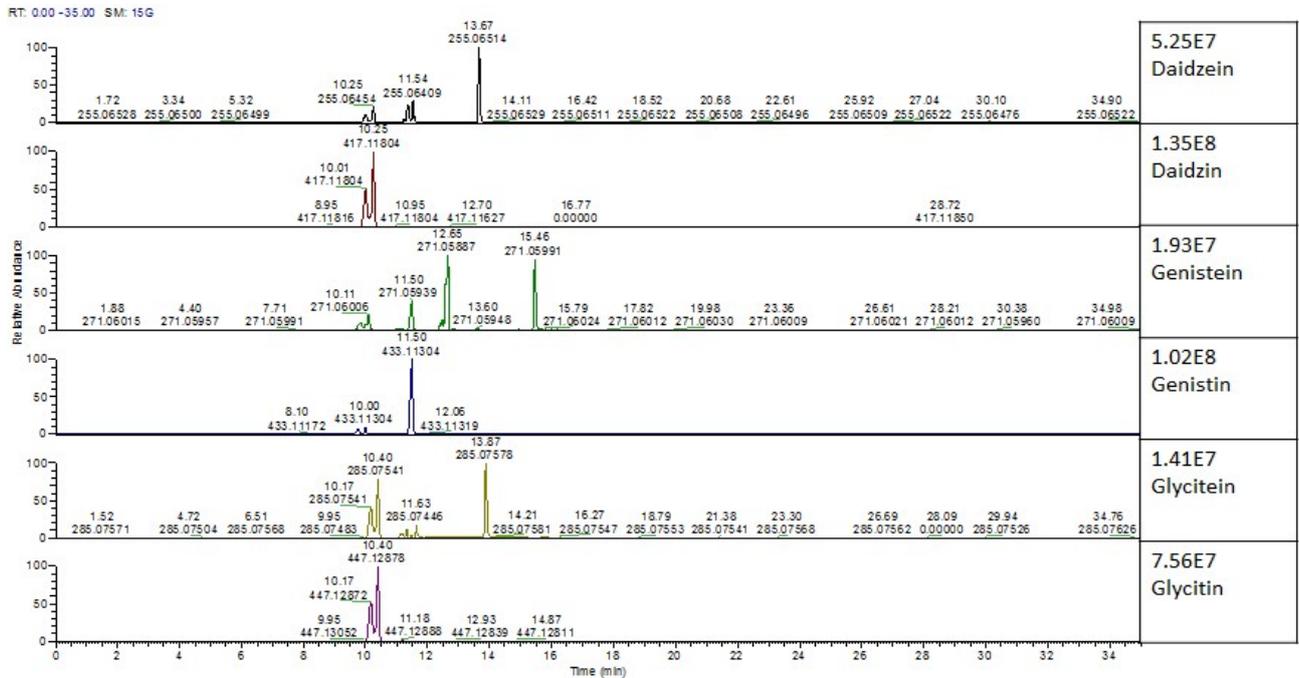


그림 67. LC - Orbitrap MS를 이용한 대두의 이차대사산물 대사체 Total Ion Chromatogram ; (a) 경기도 (b) 전라도

(나) 일차적으로 선별한 주요 표적물질은 모든 대두시료에 존재하는 것으로 확인했으며, 정량적 차이에 따른 원산지 판별 모델 구성인자로서의 evaluation을 진행하고 있다.

(a)



(b)

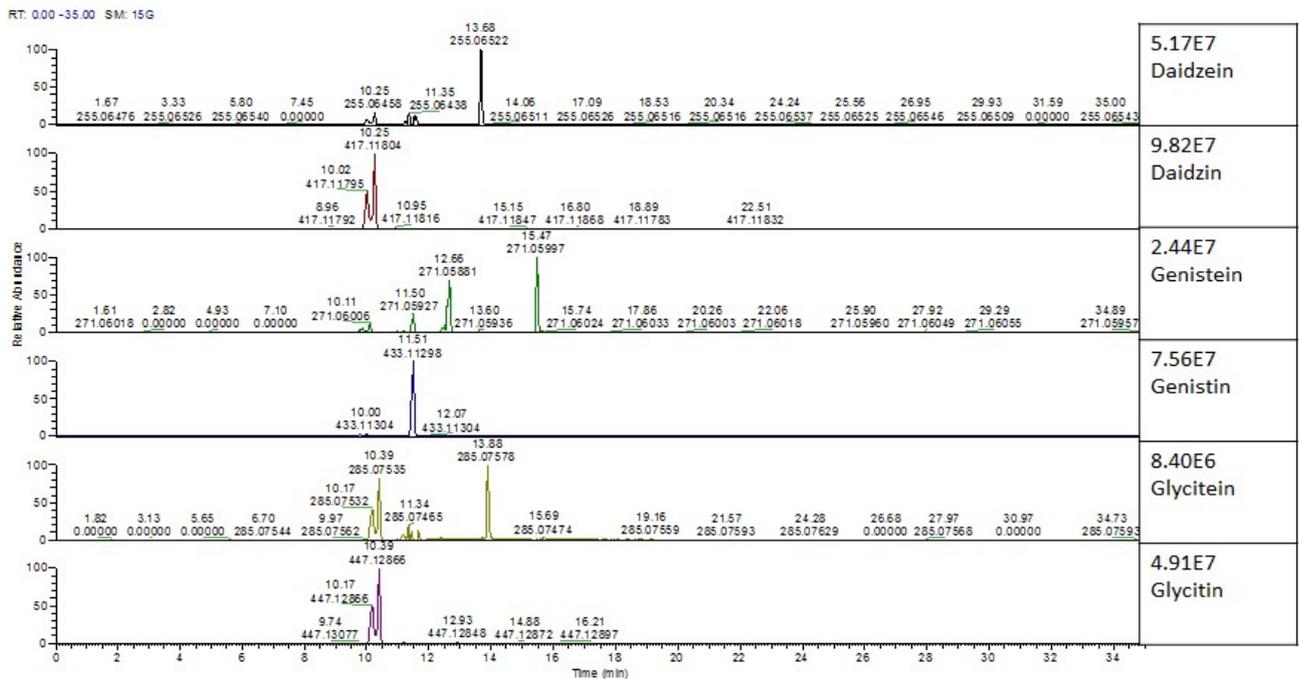


그림 67. LC - Orbitrap MS를 이용한 대두의 이차대사산물 대사체 중에서 Isoflavone 6종류 Extracted Ion Chromatogram ; (a) 경기도 (b) 전라도

(다) 현재 표적물질 프로파일링은 7종의 기준물질의 동시분석을 통해 수행하였으며, universal method에 의해 이와 별개로 다양한 이차대사산물이 검출되는 것으로 확인하였다.

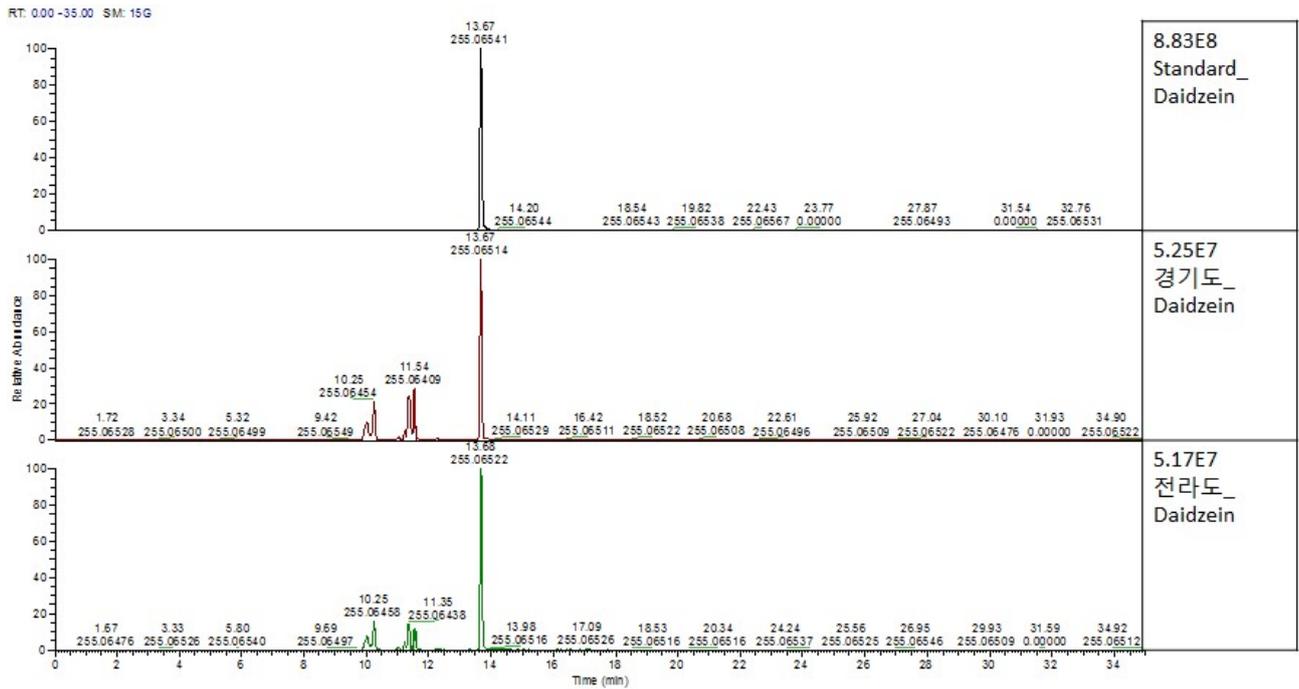


그림 69. Isoflavone 대사체 Daidzein을 Standard로 확인.

(8) 대두시료의 1, 2, 3차 분석을 통한 원산지별 / 연도별 대사체 유동성 연구

(가) 대두시료의 원산지 1차 2차 연도 데이터 연계분석 및 상호비교.

- 대두시료의 원산지 판별의 신뢰도와 field의 활용성을 높이기 위하여 다년간 획득한 샘플의 포괄적 대사체 유동성 분석을 시행하였다. 이에 2015년도, 2016년도와 2017년도 각 원산지별 대두시료의 대사체 함량을 분석하고, 연도별 강수량, 일조량등 confounding variable을 일차적으로 선별하여, 당해연도 구축된 원산지 판별 대사체 모델의 최적화를 수행하였다. 총 3개년도 대두시료의 총합적 결론을 통한 최종 최적화 모델을 구축하였다.

(나) 대두시료의 원산지 비특이적 연도 영향인자 발굴 (그림 70, 표 39).

- 구축된 ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA) 분석플랫폼을 이용하여 원산지 특이적 요인 대사체와 연도 특이적 요인 대사체, 그리고 두요소간의 상호작용 대사체를 확인하였다.

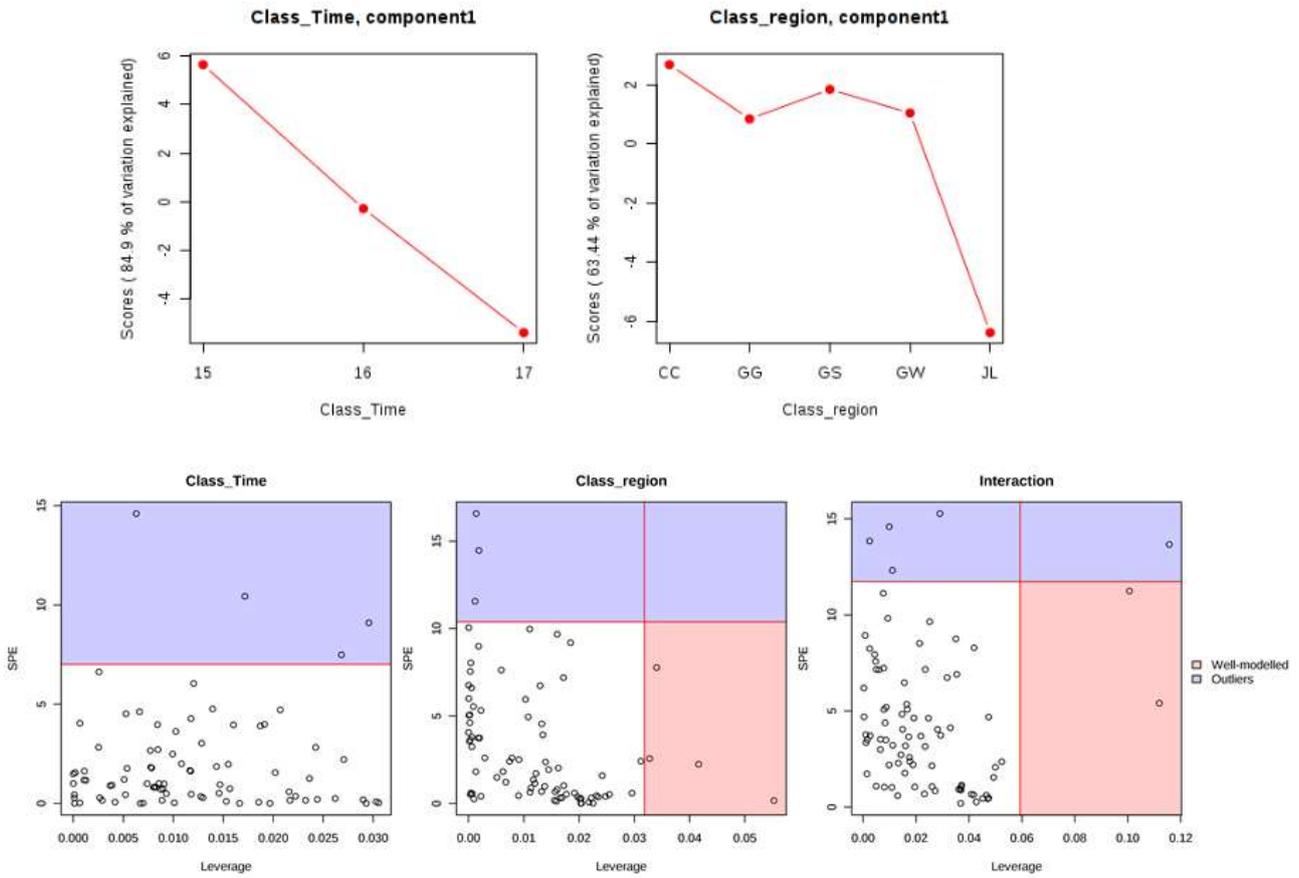


그림 70. 대두시료의 원산지 비특이적 영향인자 발굴

표 39. 대두시료의 원산지 비특이적 영향인자 리스트

	Compound	Leverage	SPE
Time	-	-	-
Region	4-Coumaric acid	0.055272	0.165437
	Betaine	0.04163	2.24579
	N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	0.034028	7.77233
	Prolylleucine	0.032766	2.57011
Interaction	L-Aspartic acid	0.02903	15.2687
	Coumarin	0.009862	14.5873
	Soyasaponin γ a	0.002476	13.8401
	Acetyldaidzin	0.1157	13.6622
	D-Glutamine	0.011099	12.3164

(9) 분석시스템간 통합적 데이터 프로세스 개발(질량분석기-NMR)

(가) O2PLS 분석기법을 적용한 빅데이터 integration 및 주요인자 도출 (그림 71)

- Two orthogonal partial least squares statistics를 적용하여, MS 결과와 NMR 결과에 각각 unique한 variable을 선별하였다. 동시에 두 분석 플랫폼간의 높은 상관관련성을 갖는 인자를 도출하여, 이를 통해 그룹 간 discrimination power를 극대화 할 수 있는 조합을 정의하고, joint variable과의 상관관계도 규명하였다.

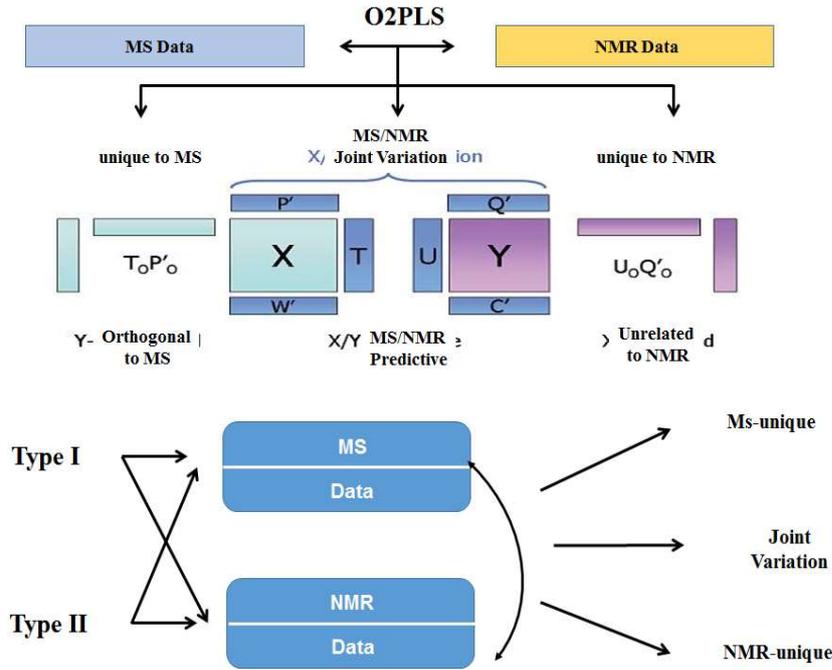


그림 71. 통합적 데이터 프로세스 플랫폼 제시.

(10) 7개의 도에서 재배된 대두 시료를 동시에 구별할 수 있는 바이오마커 패널을 찾아내기 위해 다양한 통계적 방법을 사용

(가) 총 Flavonoid의 함량과 항산화 효과 분석 (그림 72)

- 총 Flavonoid의 함량을 측정된 결과 전라북도에서 다른 지역과 비교하여 유의수준있게 적은 것을 확인하였다.
- 항산화 효과를 측정된 결과 전라북도과 전라남도 지역에서 다른 지역과 비교하여 유의 수준 있게 적은 것을 확인하였다.
- 이로 인해 전라북도 지역이 다른 지역과 비교하여 이차 대사산물의 함량이 적은 것을 일차적으로 확인하였다.

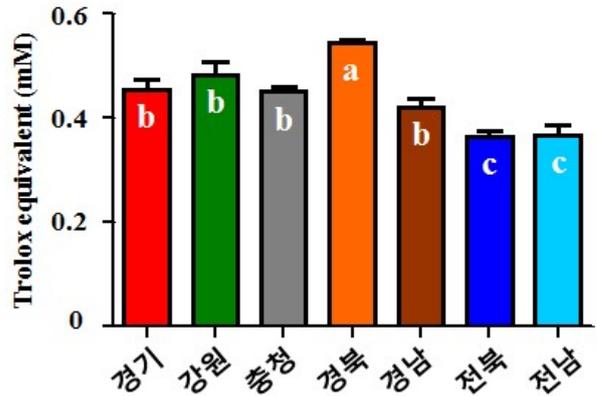
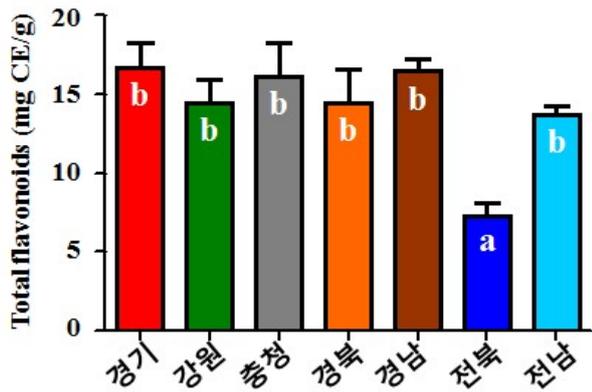
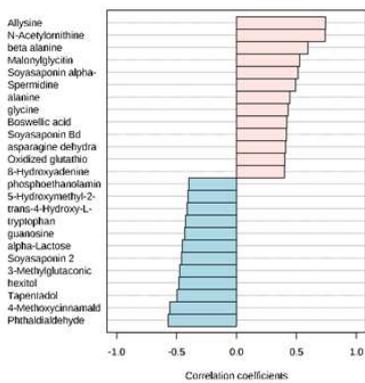


그림 72. 각각 Flavonoid의 함량과 항산화 효과 측정

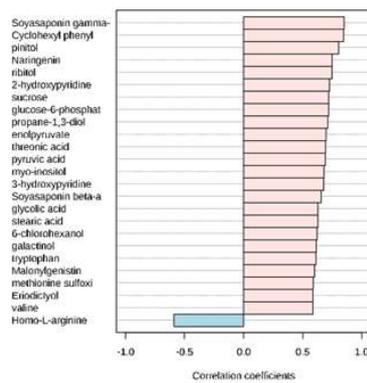
(나) Pattern search 실시 (그림 73)

- Pattern search를 이용하여 각 도별로 나머지 6개의 도와 비교했을 때 대사물질들의 변화를 통계적으로 검증하였다.

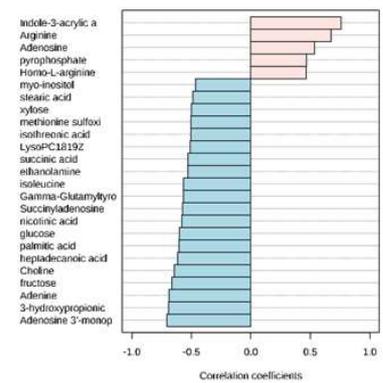
[경기] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 2-1-1-1-1-1



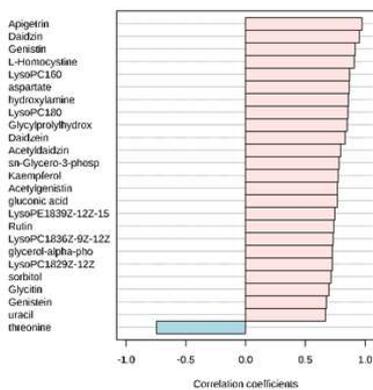
[강원] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-2-1-1-1-1



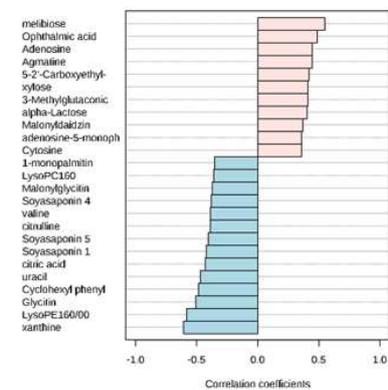
[충청] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-2-1-1-1



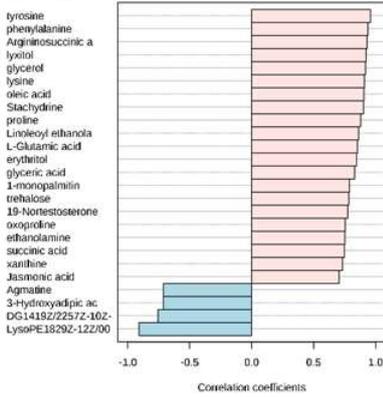
[경북] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-1-2-1-1-1



[경남] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-1-1-2-1-1



[전북] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-1-1-1-2-1



[전남] Top 25 peaks(mz/rt) correlated with the 1-1-1-1-1-2

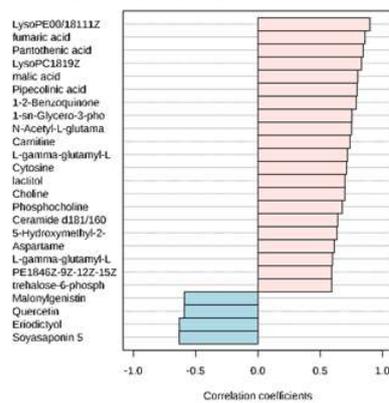


그림 73. 각 도별로 유의 수준 있게 변화하는 대사물질 리스트 (Top 25개)

(다) HCL에서 Basal expression pattern를 확인 (그림 74)

- 전체적인 pattern을 확인했을 때, 경상북도, 강원도 지역이, 전라남도과 경상남도 지역이, 경기도와 충청도 지역이 다른 지역들과 비교하여 가장 대사체의 변화가 유사한 것을 확인하였다.
- 경상북도 지역의 경우 강원도 지역과 유사한 대사체 변화를 가지고 있으며, 다른 6개의 도와 비교하여 대체적으로 이차 대사산물(Acetylglucosides, Glycosides, Aglycones)의 변화가 큰 것을 확인하였다.
- 전라도의 지역의 경우, 다른 6개의 도와 비교하여 일차 대사산물의 변화가 큰 것으로 확인하였다.

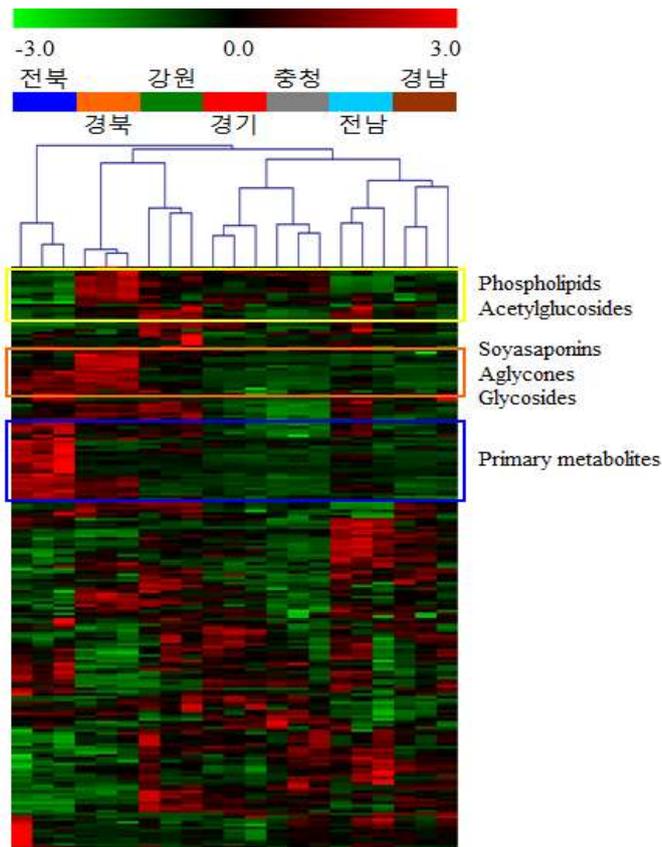


그림 74. HCL에서의 Basal expression pattern

(라) Unsupervised multivariate statistics (그림 75).

- 주성분분석 (PCA)를 이용하여 분석 한 결과, 국내 7개의 도에서 재배되는 대두시료에서 검출된 대사체들의 차이를 확인할 수 있었다.

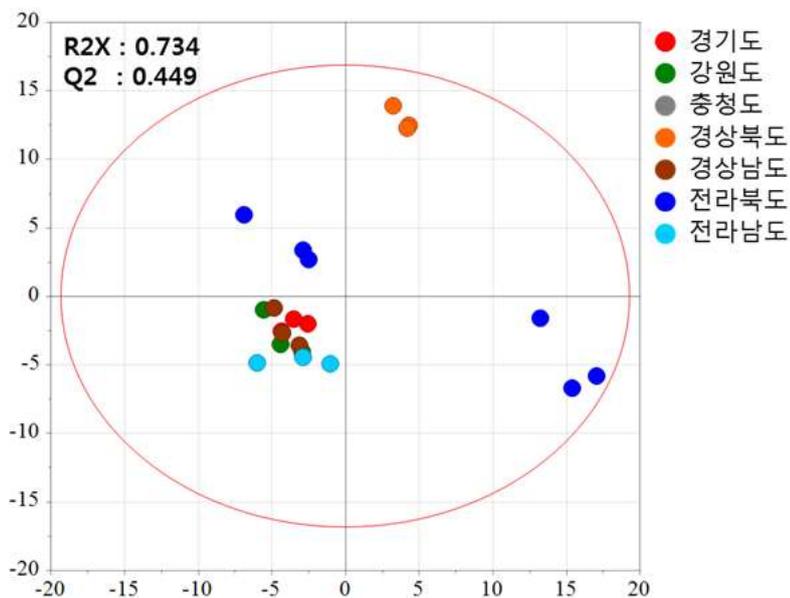


그림 75. Unsupervised multivariate statistics

(마) Supervised multivariate statistics (그림 76).

- 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 적용하였을 때, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었으며 ($R^2Y = 0.946$, $Q^2 = 0.778$), 그룹 정보와 관련이 없다고 여겨지는 인자를 모두 y 벡터에 위치시킴으로써 주성분분석(PCA)과 비교하여 더욱 향상된 그룹간의 구별을 확인할 수 있었다.

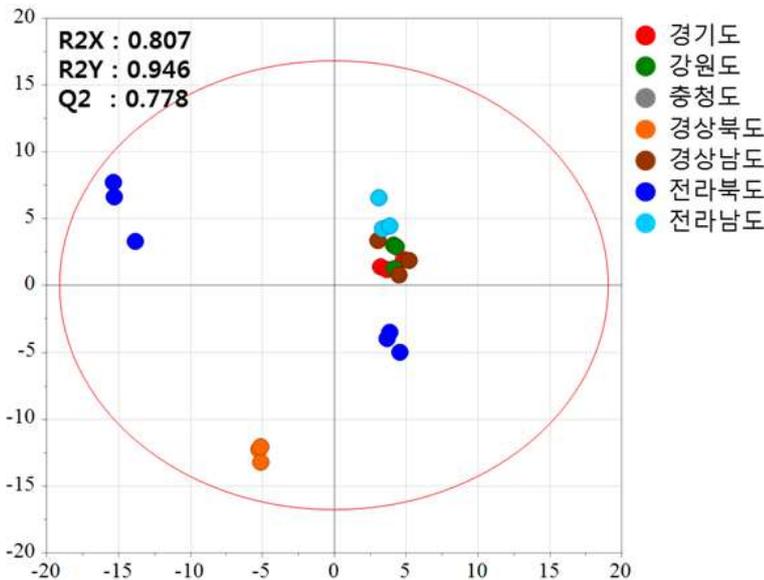
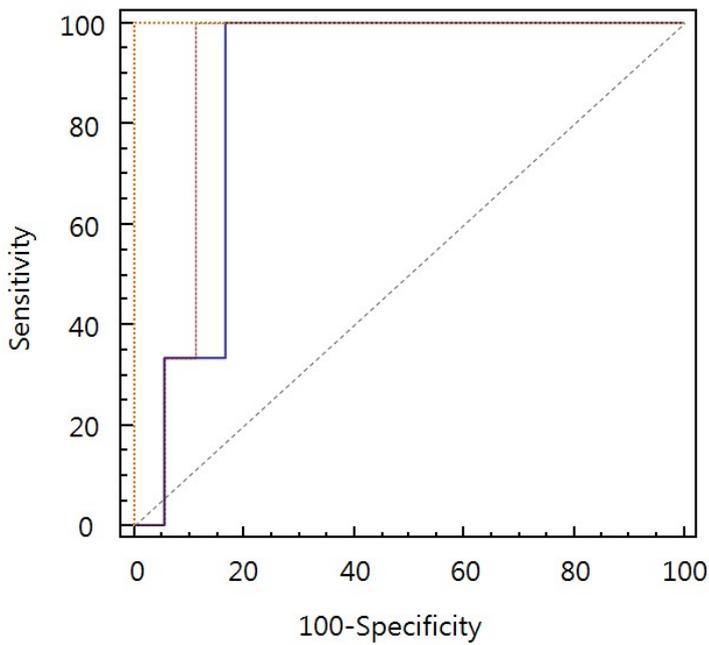
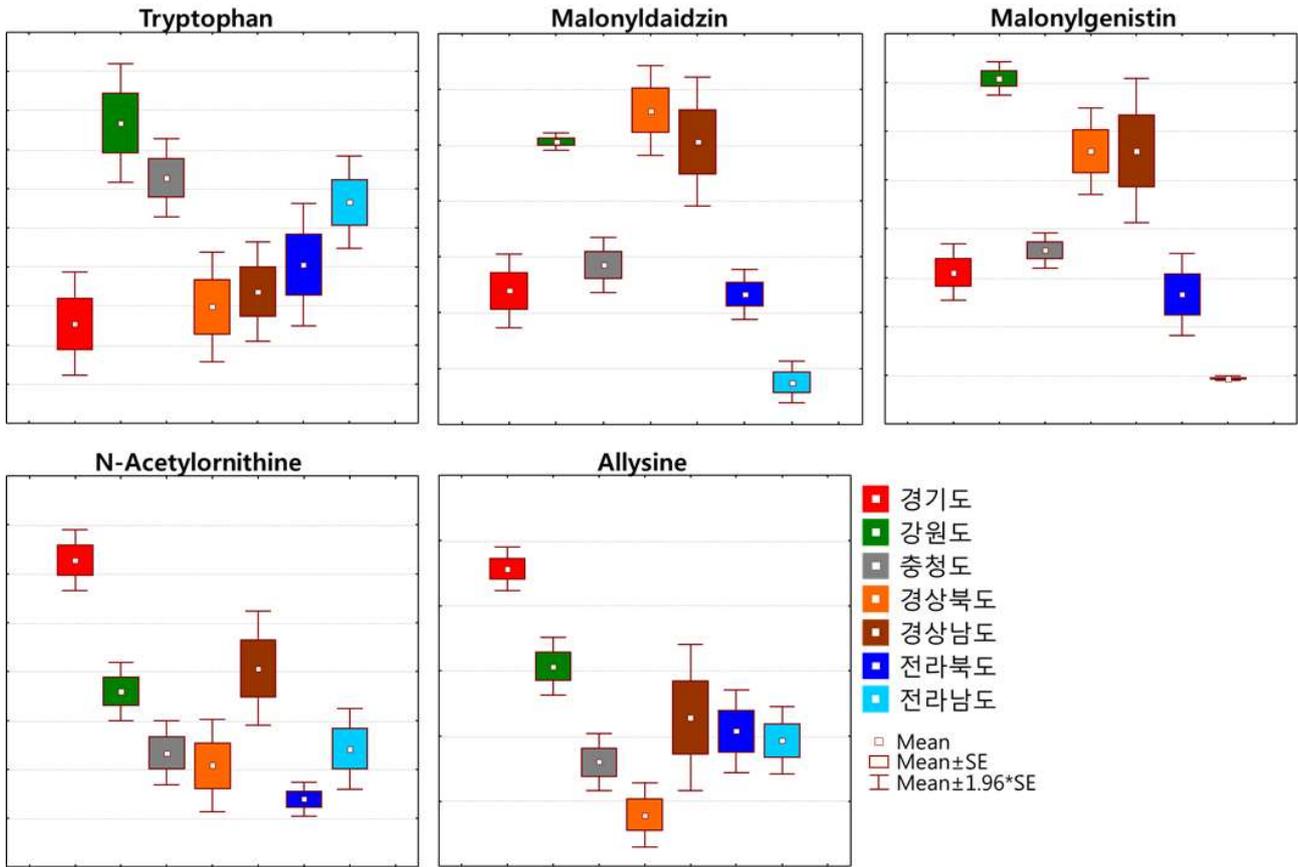


그림 76. Supervised multivariate statistics

(바) ROC Curve analysis (그림 77)

- 바이오마커 후보 대사물질을 스크리닝 하기위해 다양한 통계적 방법을 사용하였고, 이에 VIP (Variable importance) score 순위나 교집합, 여집합의 개념을 도입하여 여러 가지 대사물질들의 조합을 만들어 생체 지표로서의 가능성을 평가하였다.
- 다양한 테스트를 거친 결과 OPLS-DA 모델에서의 VIP가 높은 대사물질들의 조합이 7개의 도를 가장 잘 구별해 주는 것을 확인하였고, 따라서 이에 집중적으로 바이오마커 composite을 최적화하였다. VIP score가 높은 대사물질부터 차례대로 수를 늘려가며 조합을 만들어 ROC (Receiver operating characteristic) Curve analysis를 한 결과 5개의 대사물질의 구성이 가장 좋은 AUC Value를 나타내었다. 최종적으로 선택된 5개의 대사물질은 Tryptophan, Malonyldaidzin, Malonylgenistine, N-Acetylornithine, Allysine으로 구성되어 있으며 이들 조합의 AUC value는 충청도-others는 0.870, 경상남도-others는 0.907, 경기도-others, 강원도-others, 경상북도-others, 전라북도-others, 전라남도-others는 모두 1이었다.



Region	AUC	95% CI
경기도	1.000	0.839 to 1.000
강원도	1.000	0.839 to 1.000
충청도	0.870	0.653 to 0.975
경상북도	1.000	0.839 to 1.000
경상남도	0.907	0.700 to 0.989
전라북도	1.000	0.839 to 1.000
전라남도	1.000	0.839 to 1.000

그림 77. ROC (Receiver operating characteristic) Curve analysis

(11) 3개의 국가 (한국, 중국, 미국)의 대두 시료 분석을 통해 원산지 판별

(가) 일차 대사산물과 이차 대사산물을 GC-TOF MS와 LC-Orbitrap MS를 이용하여 분석하였으며 데이터 프로세스 결과 총 174개의 대사체를 Identification하였다 (그림 78).

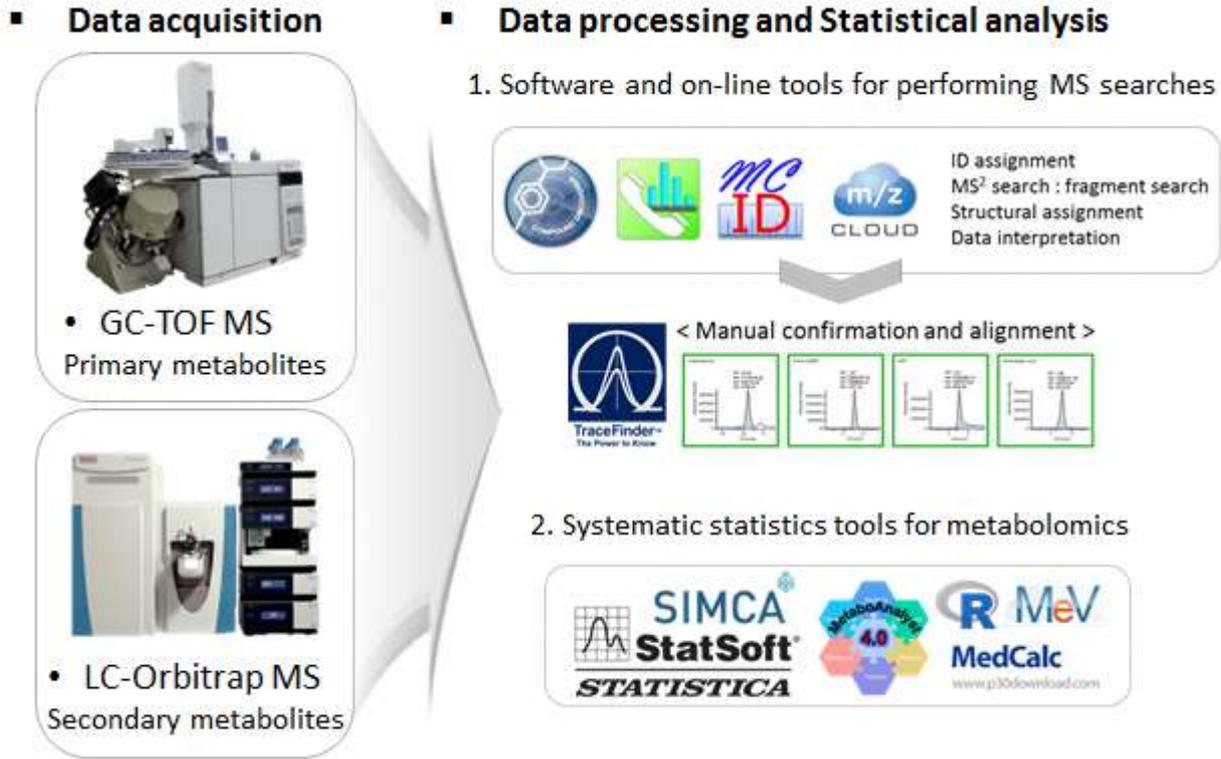


그림 78. GC-TOF MS와 LC Orbitrap MS를 이용한 platform

(나) Unsupervised multivariate statistics (그림 79).

- 주성분분석 (PCA)를 이용하여 분석 한 결과, 국내산, 중국산, 미국산의 대두 시료에서 검출된 대사체들의 차이를 확인할 수 있었다.

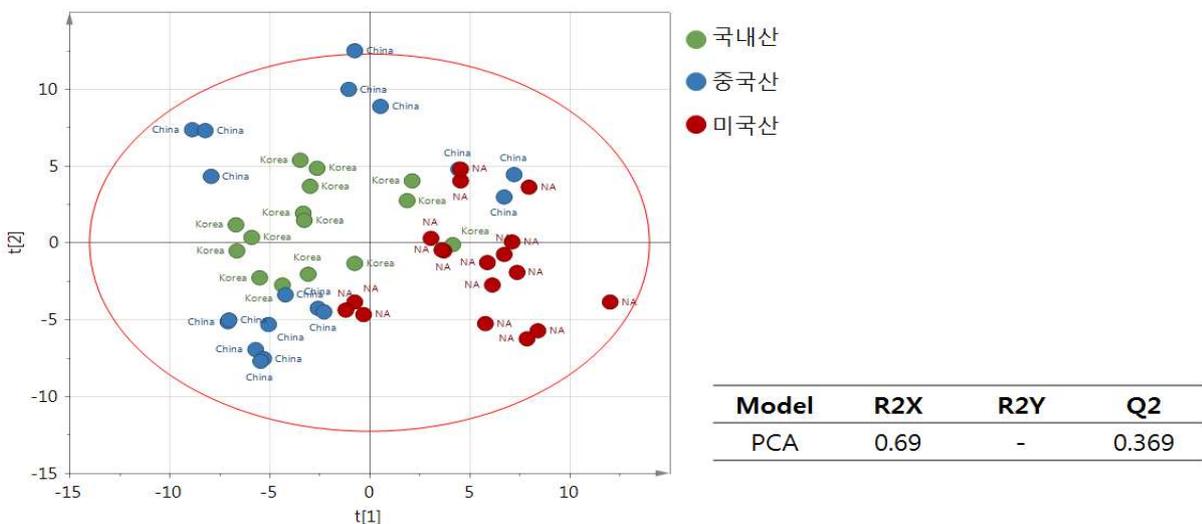


그림 79. PCA

(다) Supervised multivariate statistics (그림 80).

- 부분최소자승판별 분석 (PLS-DA)를 적용하였을 때, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었다 ($R^2Y = 0.974$, $Q^2 = 0.886$).

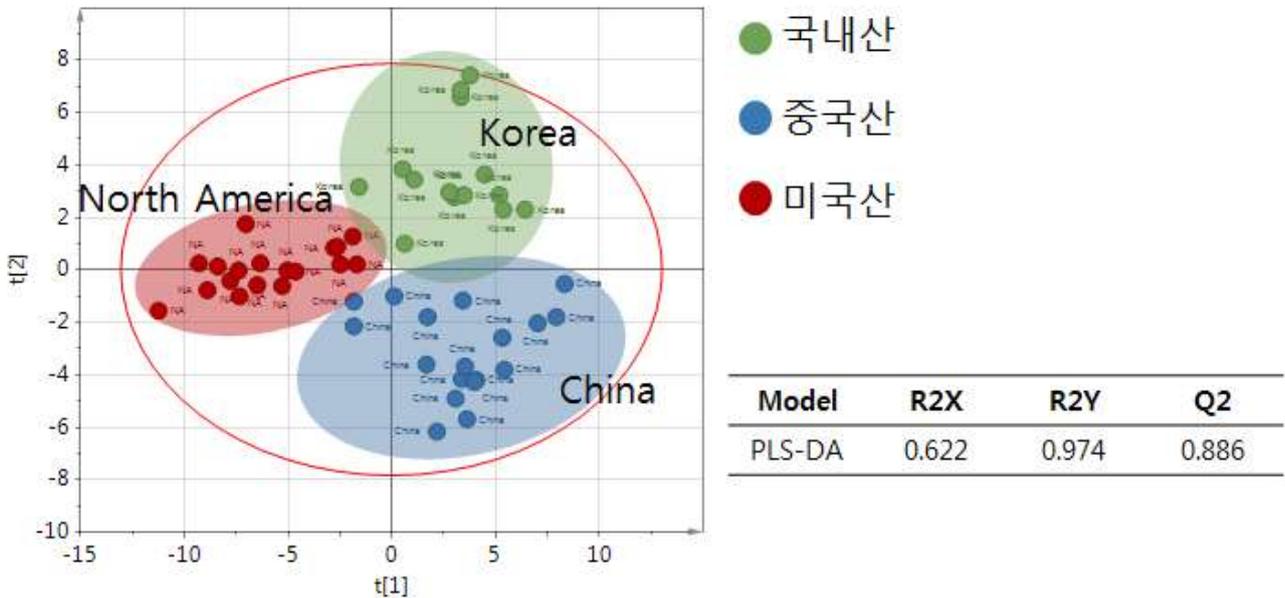


그림 80. PLS-DA

(라) ROC Curve analysis (그림 81)

- VIP score를 고려하여 여러 가지 대사물질을 조합하여 최종적으로 5개의 대사물질 (Choline, Lyxose, Malic acid, Fumaric acid, Threonic acid)을 구성함.
- 각각의 AUC value는 국내산-others는 0.996, 중국산-others는 0.857, 미국산-others는 0.985이다.

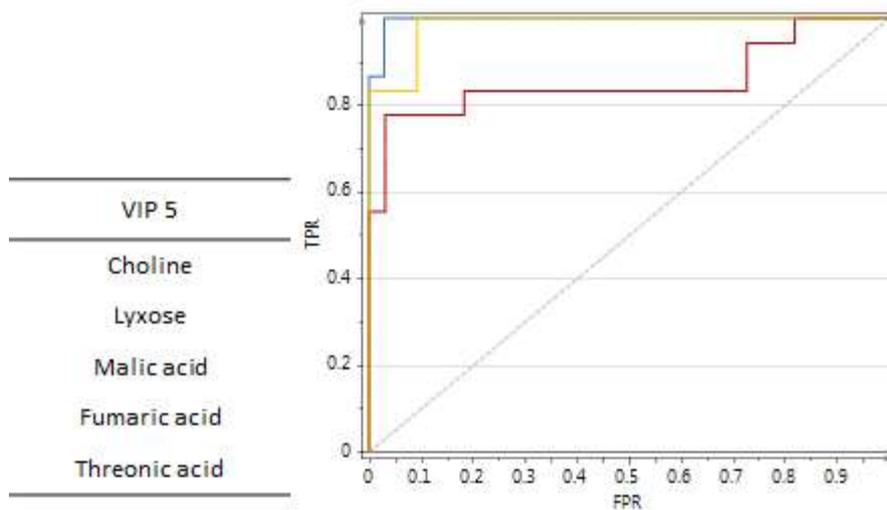


그림 81. ROC analysis.

(12) 참깨시료의 질량분석기기 연계적 데이터분석 및 원산지 특이적 지표 발굴 (LC-MS)

(가) 이차 대사산물을 LC-Orbitrap MS를 이용하여 분석하였으며 데이터 프로세스 결과 총 138 개의 대사체를 Identification하였다 (그림 82).

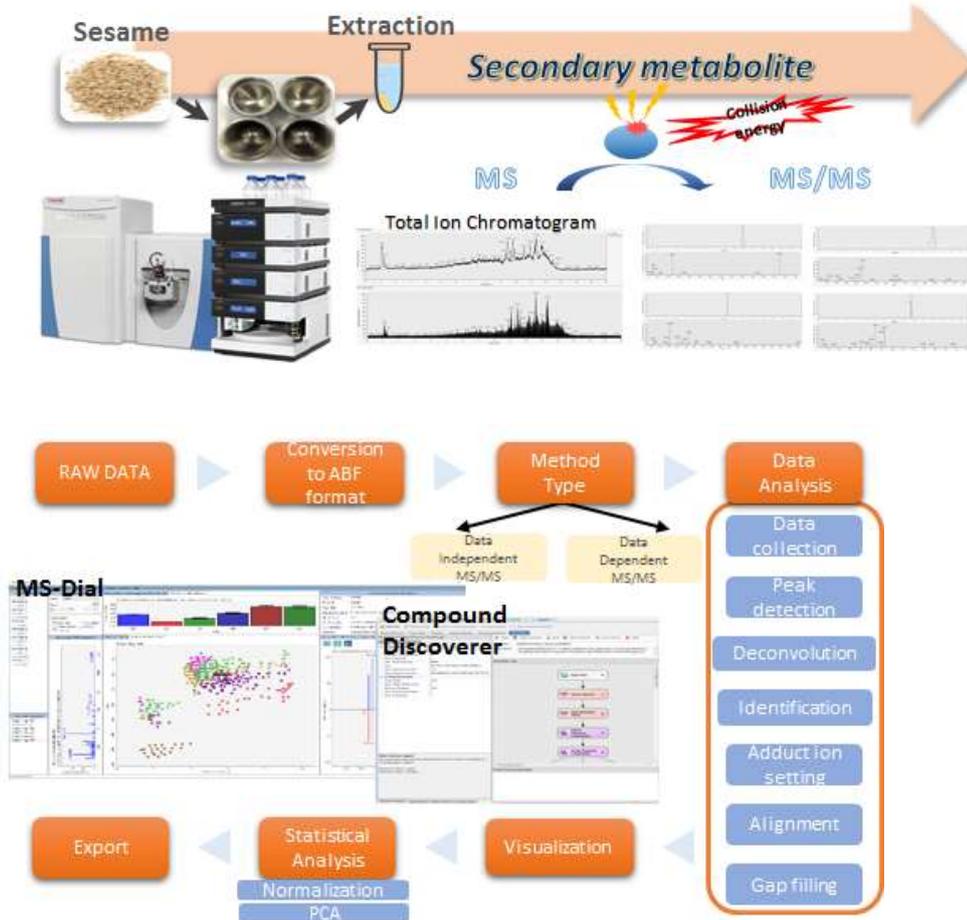


그림 82. LC- Orbitrap MS를 이용한 platform

(나) 단변량 통계 분석 (Univariate statistics) 실시 (표 40)

- Student's T-Test를 이용하여 국내산과 외국산을 비교했을 때 대사물질들의 변화를 통계적으로 검증하였다.

표 40. 각 반도별로 유의 수준 있게 변화하는 대사물질 리스트 (Student's T-Test < 0.05)

Highly abundant in 국내산 compared to others		Highly abundant in 수입산(China, Foreign) compared to others	
Metabolite name	Fold change	Matabolite name	Fold change
Argininosuccinic acid	4.003682	Nicotinamide	3.6207149
L-Glutathione (reduced)	2.688703	Diosmetin	3.5549309
N2-Methylguanosine	2.573956	N-Acetylsphingosine	3.0897016
D-(-)-Glutamine	1.843894	9-Oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	2.6347638
L-Tyrosine	1.836202	D-Raffinose	2.5130031

Adenosine 5'-monophosphate	1.823579	3-Hydroxypicolinic acid	2.3705172
4-Coumaric acid	1.716631	DL-Carnitine	1.8651172
S-Adenosylhomocysteine	1.628219	Glycerophospho-N-palmitoyl ethanolamine	1.8158063
Betaine	1.619923	Adenine	1.7786963
5'-S-Methyl-5'-thioadenosine	1.598663	Pyridoxine	1.7785812
Leucine	1.561135	Palmitoleic acid	1.7756623
Valine	1.508279	Scopoletin	1.7139806
N6-Methyladenine	1.430438	D-(+)-Camphor	1.5763759
L-Threonine	1.396094	Norharman	1.5600807
L-Saccharopine	1.377169	Imidazolelactic acid	1.5475888
4-Hydroxybenzaldehyde	1.356751	Kanosamine	1.5207067
2-Amino-1,3,4-octadecanetriol	1.325601	Methyl indole-3-acetate	1.4537668
7-Methyladenine	1.29964	L-Aspartic acid	1.4316024
Creatinine	1.224136	4-Guanidinobutyric acid	1.4198564
		Dihydrothymine	1.414131

(다) SAM 분석 (그림 83).

- 국내산과 수입산을 같이 비교하였을 때, 4개의 대사 물질 (N2-Methylguanosine, 4-Coumaric acid, Valine, L-Glutathione(reduced))이 특징을 보였다.
- 대체적으로 국내산은 수입산에 비해 up regulated 되었으며, 수입산이 down regulated 된 것을 확인 할 수 있었다.

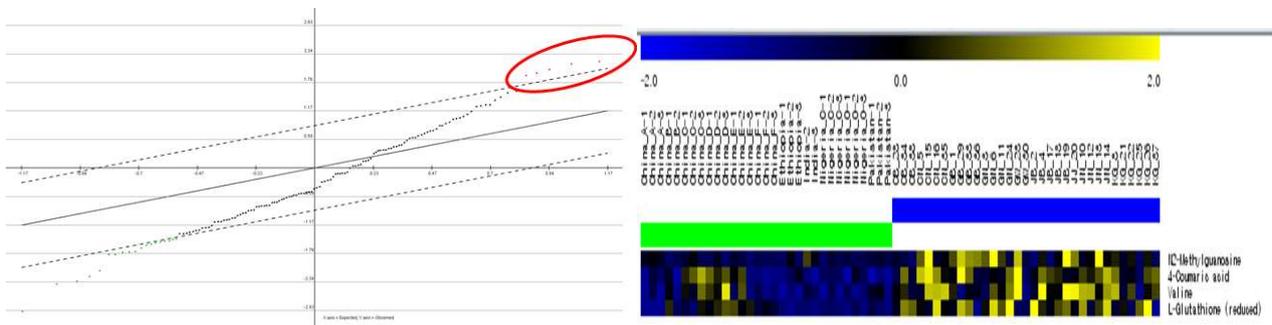


그림 83. SAM analysis

(라) Supervised multivariate statistics (그림 84)

- 부분최소자승판별 분석 (PLS-DA)를 적용하였을 때, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었다 (R2Y = 0.955, Q2 = 0.794).

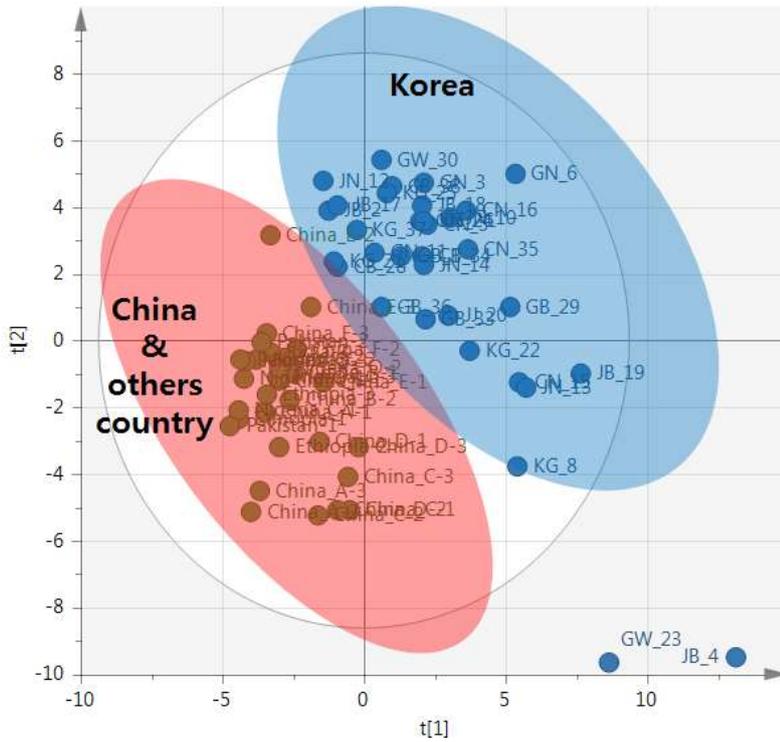


그림 84. PLS-DA analysis

(마) ROC Curve analysis (그림 85)

- VIP score를 고려하여 여러 가지 대사물질을 조합하여 최종적으로 5개의 대사물질 (D-Raffinose, L-Glutathione (reduced), Adenosine 5'-monophosphate, Valine, 2-Amino-1,3,4-octadecanetriol) 을 구성하였다.
- 각각의 AUC value는 0.954이다.

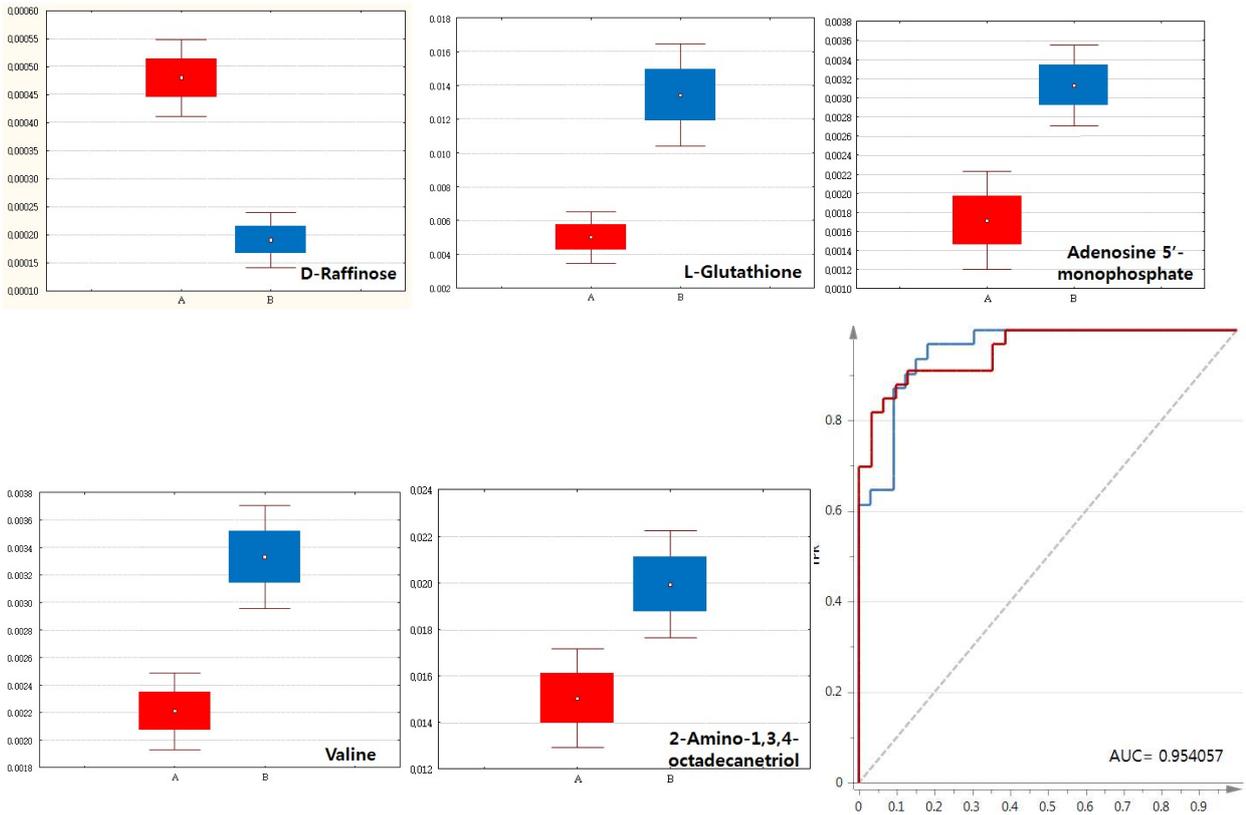


그림 85. ROC analysis

(13) 참깨시료에 존재하는 대사체(metabolic features)의 정량적 데이터베이스 구축

표 41. LC-MS 분석을 통해 참깨의 이차대사산물 및 기능성 대사산물의 표적물질 프로파일링 플랫폼을 구축

Metabolite name	Molecular Weight	Metabolite name	Molecular Weight
Choline	103.0997	3-Hydroxypicolinic acid	139.0269
Pyrrrole-2-carboxylic acid	111.032	Guvacoline	141.079
Cytosine	111.0433	DL-Stachydrine	143.0946
Histamine	111.0796	8-Hydroxyquinoline	145.0527
Uracil	112.0273	4-Guanidinobutyric acid	145.0851
Creatinine	113.0589	Acetylcholine	145.1103
N-Methylhydantoin	114.0429	Spermidine	145.1579
D-(+)-Proline	115.0633	Coumarin	146.0368
Betaine	117.0789	D-(-)-Glutamine	146.069
Valine	117.0789	5,6-Dimethylbenzimidazole	146.0844
L-Threonine	119.0582	L-Lysine	146.1055
4-Hydroxybenzaldehyde	122.0368	L-Glutamic acid	147.053
Nicotinamide	122.048	Methionine	149.0511
Nicotinic acid	123.0321	7-Methyladenine	149.0701
Maltol	126.0316	N6-Methyladenine	149.0702
Phloroglucinol	126.0316	4'-Methoxyacetophenone	150.068
Dihydrothymine	128.0585	Guanine	151.0494
L-Pyroglutamic acid	129.0426	2-Phenylglycine	151.0634
Isoquinoline	129.0578	L-(-)-Arabitol	152.0684
Pipecolic acid	129.079	D-(+)-Camphor	152.1201
Skatole	131.0735	3-Hydroxyanthranilic acid	153.0426
Leucine	131.0946	L-Histidine	155.0695
L-Norleucine	131.0947	Imidazolelactic acid	156.0535
Ornithine	132.0899	3-(2-Hydroxyethyl)indole	161.084
L-Aspartic acid	133.0374	DL-Carnitine	161.1051
Adenine	135.0545	4-Hydroxycoumarin	162.0316
Hypoxanthine	136.0385	7-Hydroxycoumarine	162.0317
3-Methoxybenzaldehyde	136.0525	4-Methoxycinnamaldehyde	162.068
Trigonelline	137.0476	Methyl cinnamate	162.068
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	138.0317	4-Coumaric acid	164.0473

Metabolite name	Molecular Weight	Metabolite name	Molecular Weight
7-Methylguanine	165.0651	Indole-3-pyruvic acid	203.0581
L-Phenylalanine	165.0789	Neocuproine	208.1
Uric acid	168.0283	Valylproline	214.1318
Norharman	168.0687	Kinetin	215.0808
Pyridoxine	169.0738	N- α -L-Acetyl-arginine	216.1222
1-Methylhistidine	169.0851	(+)-ar-Turmerone	216.1515
Glycylproline	172.0847	Nootkatone	218.1671
Tryptoline	172.1001	Sinapinic acid	224.0684
DL-Arginine	174.1117	Prolylleucine	228.1474
N-Methyltryptamine	174.1157	Radicinin	236.0681
Indole-3-acetic acid	175.0633	Cytidine	243.0854
Cotinine	176.0949	Coenzyme Q1	250.1217
Esculetin	178.0265	2'-Deoxyadenosine	251.1018
Kanosamine	179.0792	Palmitoleic acid	254.2244
Caffeic acid	180.0422	Hexadecanamide	255.256
L-Tyrosine	181.0739	Indirubin	262.0742
L-threo-3-Phenylserine	181.0739	Thiamine	264.1044
L-Iditol	182.079	Adenosine	267.0966
4'-(Imidazol-1-yl)acetophenone	186.0792	Inosine	268.0806
Indole-3-acrylic acid	187.0633	Galangin	270.0526
Glycyl-L-leucine	188.1161	<i>Y</i> -L-Glutamyl-L-glutamic acid	276.0957
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	188.1524	L-Saccharopine	276.132
Kynurenic acid	189.0425	α -Aspartylphenylalanine	280.1058
Methyl indole-3-acetate	189.079	2'-O-Methyladenosine	281.1123
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	191.0583	Oleamide	281.2717
Scopoletin	192.0422	Argininosuccinic acid	290.1223
trans-3-Hydroxycotinine	192.09	9-Oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	294.2193
Isoferulic acid	194.0578	5'-S-Methyl-5'-thioadenosine	297.0895
Ferulic acid	194.0579	N2-Methylguanosine	297.1073
N3,N4-Dimethyl-L-arginine	202.1429	Diosmetin	300.0633

Metabolite name	Molecular Weight
Isotretinoin	300.2088
L-Glutathione (reduced)	307.0836
Isorhamnetin	316.0581
2-Amino-1,3,4-octadecanetriol	317.2929
15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin A1	318.2194
Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate	329.0524
Aflatoxin G2	330.0739
Prostaglandin B1	336.2299
N-Acetylsphingosine	341.2929
α -Lactose	342.116
Adenosine 5'-monophosphate	347.0629
S-Adenosylhomocysteine	384.1215
Nobiletin	402.131
Kuromanin	448.1003
Glycerophospho-N-palmitoyl ethanolamine	453.2853
Scutellarin	462.0797
18- β -Glycyrrhetic acid	470.3394
D-Raffinose	504.1687

(14) 쌀시료의 질량분석기기 연계적 데이터분석 및 원산지 특이적 지표 발굴 (GC-MS,LC-MS)

(가) 일차대사산물, 이차 대사산물을 GC-TOF MS, LC-Orbitrap MS를 이용하여 분석하였으며 데이터 프로세스 결과 총 130개의 대사체를 Identification하였다 (그림 86).

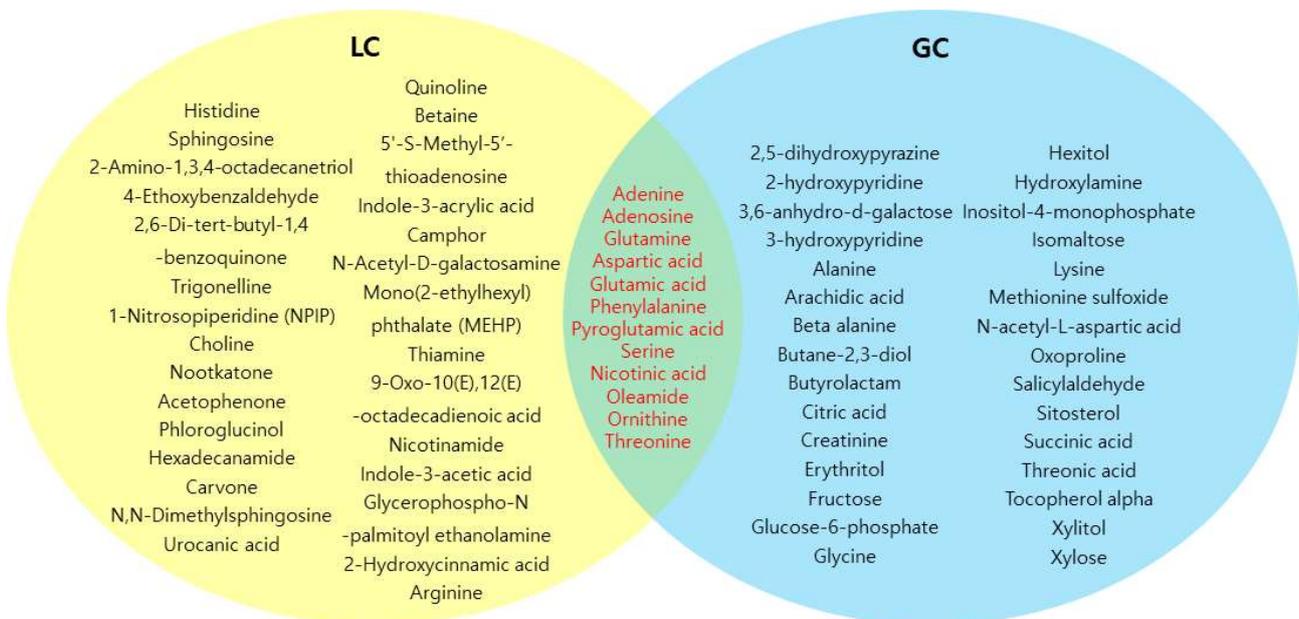


그림 86. GC-MS, LC-MS에서 Identification된 대사체 Venn diagram

(나) Supervised multivariate statistics (그림 87) .

- 부분최소자승판별 분석 (PLS-DA)를 적용하였을 때, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었다 (R2Y = 0.965, Q2 = 0.858).

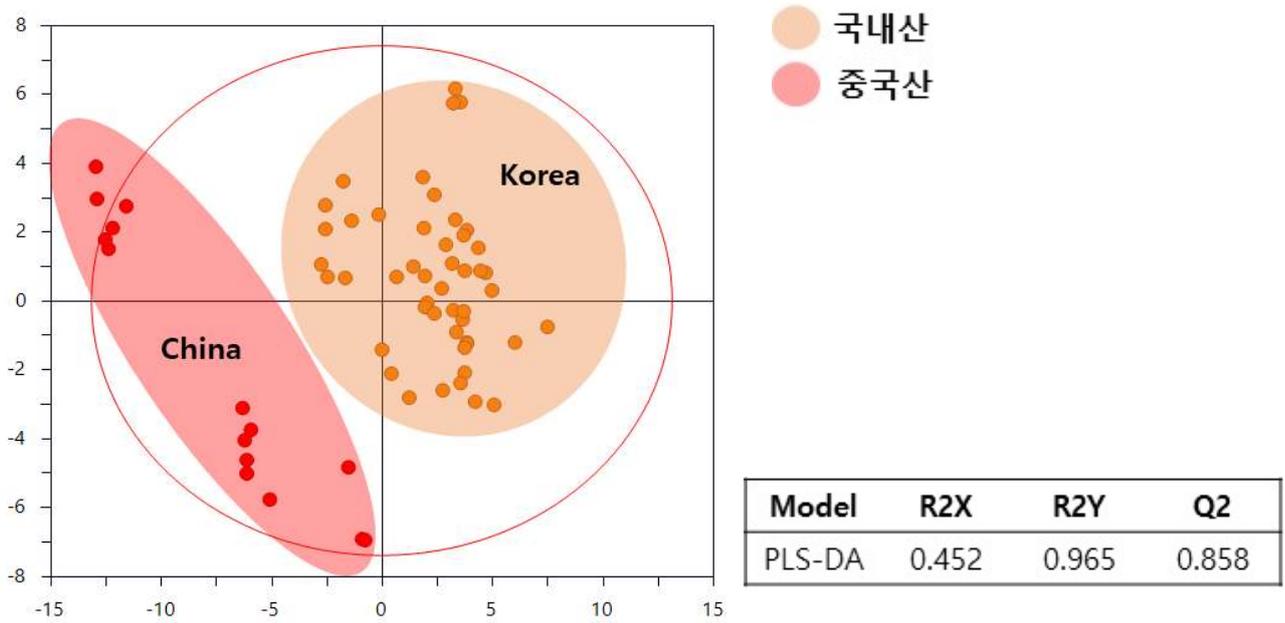


그림 87. PLS-DA analysis

(다) ROC Curve analysis (그림 88)

- VIP score를 고려하여 여러 가지 대사물질들을 조합하여 최종적으로 2개의 대사물질 (2-Hydroxycinnamic acid, Citric acid)을 구성하였다.
- china의 AUC value는 0.972, korea는 0.997이다.

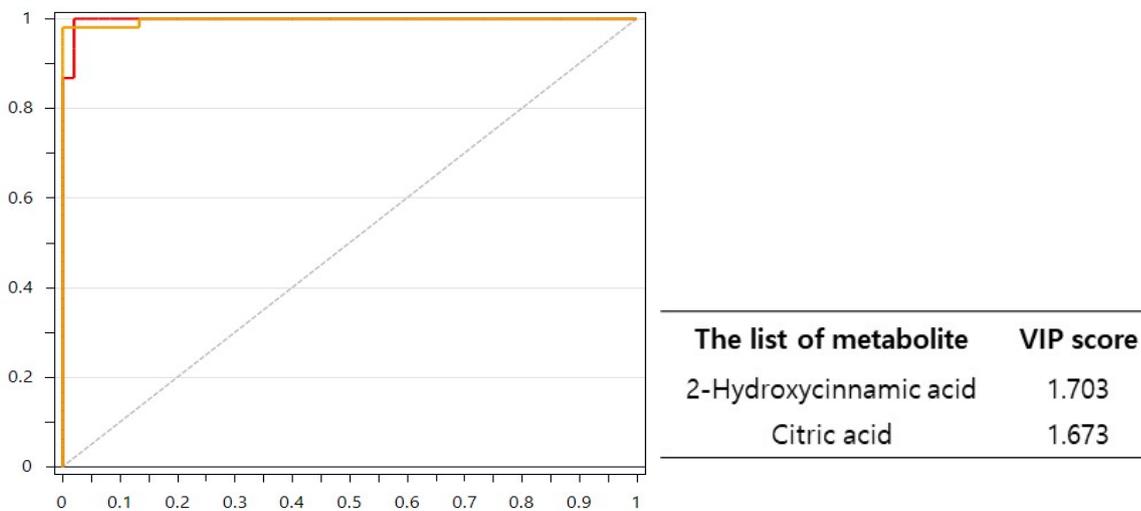


그림 88. ROC (Receiver operating characteristic) Curve analysis

(라) pattern search (그림 89)

- Pattern search를 이용하여 각 두 개 나라에서 유의수준 있게 변화하는 대사물질들의 변화를 통계적으로 검증하였다.

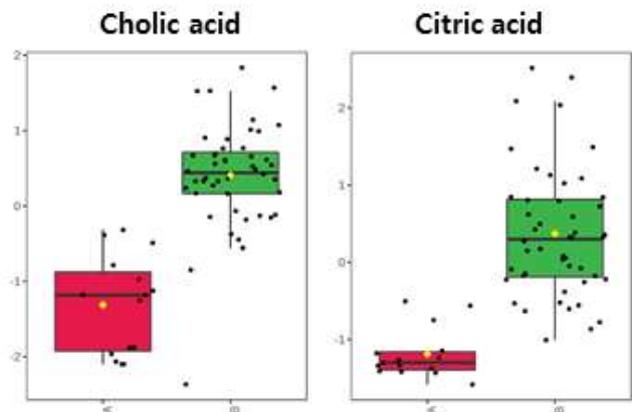
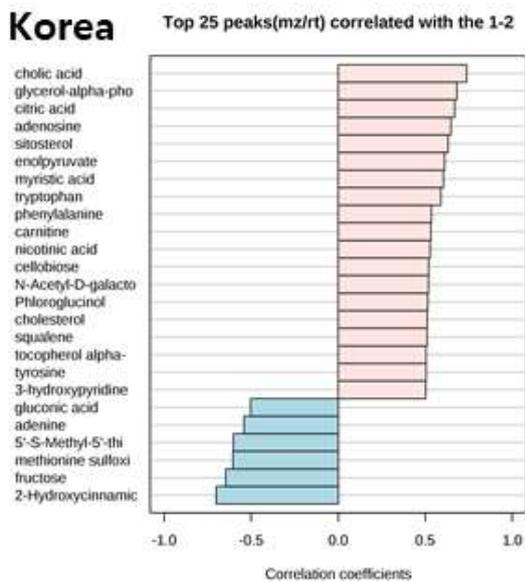
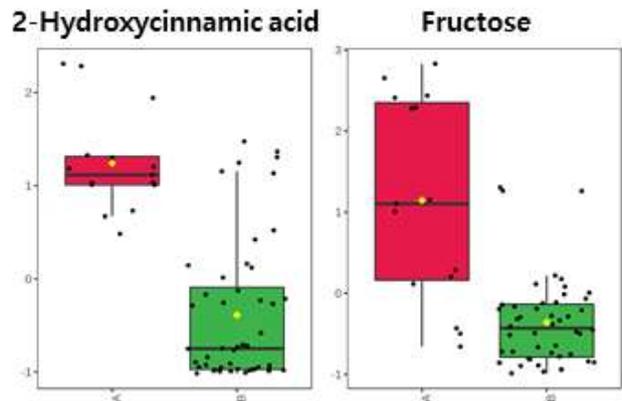
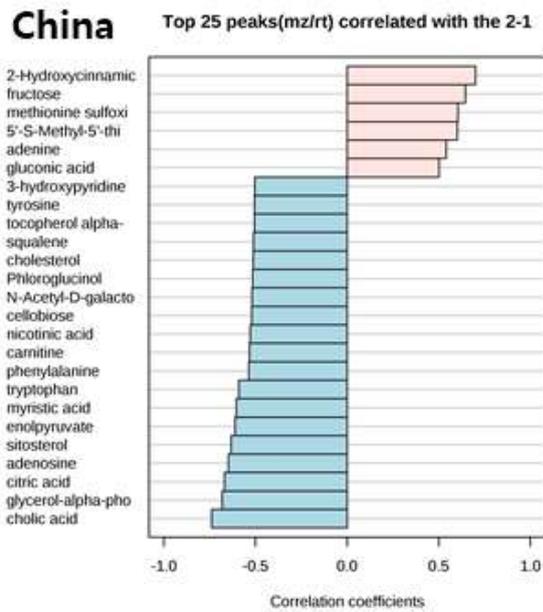


그림 89. 국내산, 중국산에서 유의 수준 있게 변화하는 대사물질

(마) Pathway analysis (그림 90)

- Pathway analysis를 이용하여 각 나라에서 pathway over-representation을 보았다.

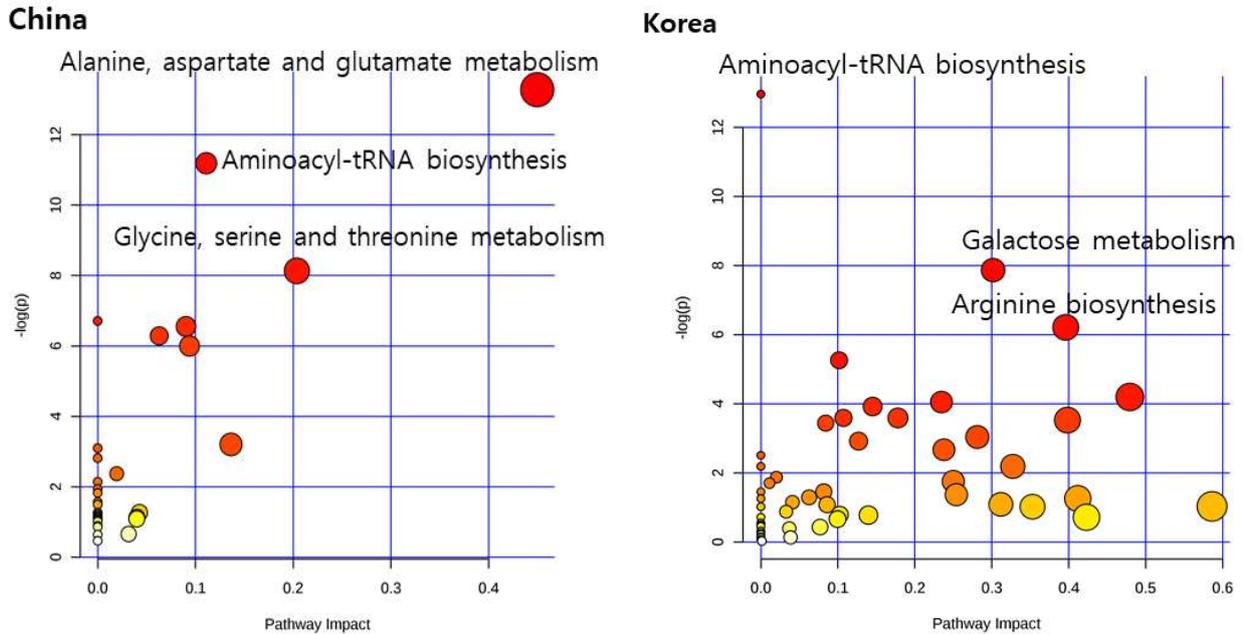


그림 90 Pathway analysis

(15) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 검증모델 구축 (그림 91, 92)

- 비생물학적 데이터 수집 및 농산물과의 대사체 상호작용 연구

비생물학적 데이터 수집 및 농산물과의 대사체 상호작용 연구와 관련하여 독특한 대사 산물 프로파일과 관련 될 수 있는 요소를 보기위해서 대두에서 지리적 및 기후 데이터를 분석하였다. 데이터에는 위도, 경도, 평균, 온도 및 총 강우량이 포함되어 있다.

그 중에서 총 강우량은 특히 8월에 군산지역에 비해 대구 지역에서 월별 패턴이 뚜렷한 것으로 나타났다. 대구 지역은 재배 기간 동안 특히 5월부터 7월까지 가장 높은 평균 기온을 나타냈지만 군산 및 강진 지역의 온도는 다른 지역에 비해 8월에서 11월까지 더 높은 수준으로 나타났다.

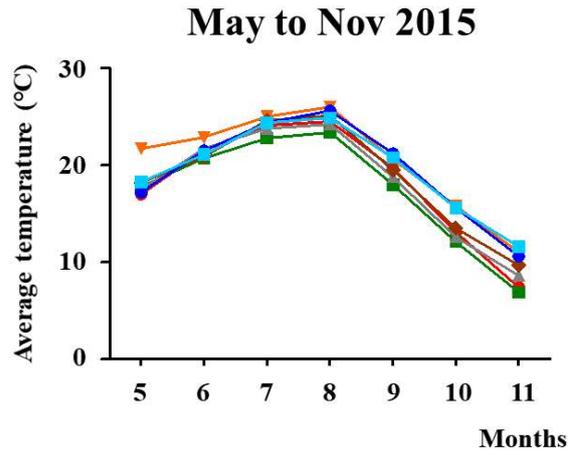
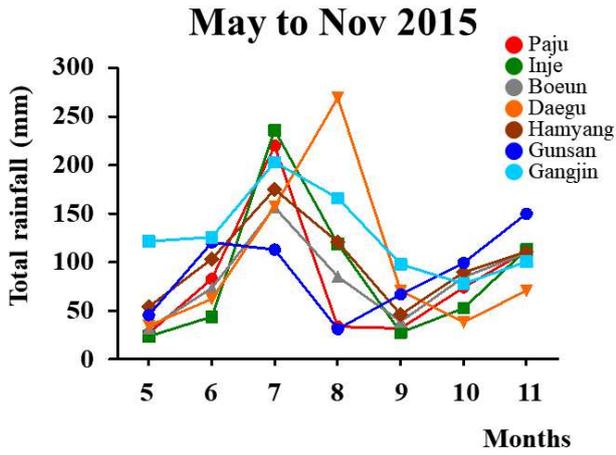


그림 91. 2015년 5월-11월 강우량, 온도

토양 조직에 대한 추가 조사가 수행되었으며 일반적으로 silt loam, sandy loam, loam soil로 분류되어있다. 군산지역의 토양조직 등급은 주로 silt loam이고 반대로 대구, 인제, 함양 지역은 sandy loam으로 분류되었으며 파주, 보은 강진 지역은 loam soil의 특징을 나타내었다.

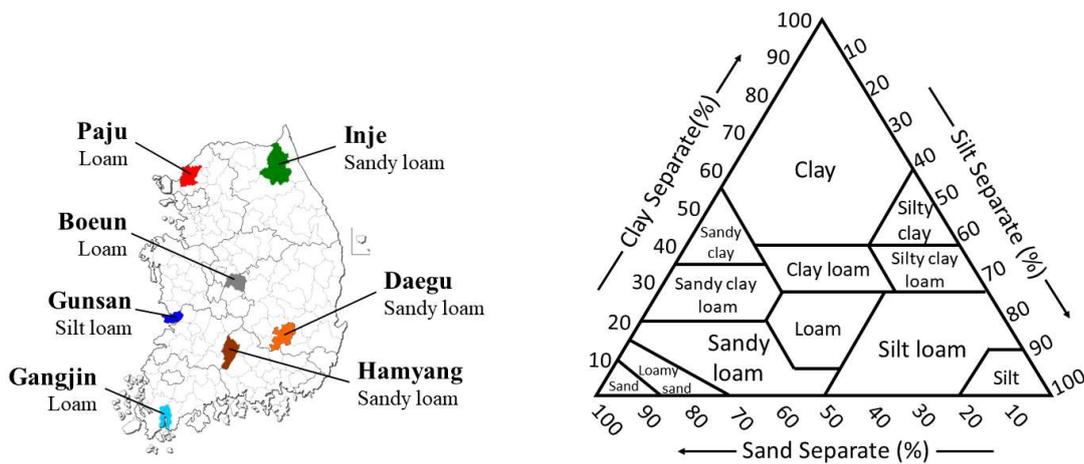


그림 92. 각 지역의 토양분류와 토양 조직도

다. 공동연구기관 2: 중앙대학교 약학과 최형균 교수

(1) 쌀겨의 NMR 기반 대사체 지문 분석

(가) 주요 농산물인 쌀의 원산지 판별을 위한 쌀겨의 예비 data 확보

① NMR기반 농산물 (쌀겨) 유래 대사체 분석을 위한 시료 추출법의 최적화

- 농산물 (쌀겨) 시료를 동결건조 후 가루로 분쇄한 후 50 mg을 계량해서 준비하였다. 1.232 g의 인산칼륨을 0.05% 3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP) 가 포함된 100 mL D₂O에 넣은 후, 1 N NaOD를 첨가하여 D₂O의 pH를 6으로 조정하였다. 농산물 (쌀겨) 시료에 MeOD 0.75 mL와 pH를 조정한 D₂O 0.75 mL를 넣고 1분간 vortexing한 후 15분간 sonication하여 추출하였다. 10분간 17,000 g에서 원심분리 한 후, 상층액을 0.45 μm PTFE syringe filter로 filtration 시킨 후, 여과액 600 μL를 5 mm NMR tube에 옮겼다.

② 농산물 (쌀겨) 유래 대사체 분석을 위한 NMR 기기조건 및 분석법 확립

- NMR spectrometer는 AVANCE 600 FT-NMR (600.13 MHz, Bruker사) 기기를 활용하였다. 농산물(쌀겨) 시료 추출물은 298 K (25 °C)에서 측정하였다. 1D ¹H-NMR에서는 pulse sequence로서 물 피크를 저하시키는 zqpr presaturation pulse sequence를 이용하였으며, relaxation delay는 2초, 128 스캔수, 12626.3 Hz의 spectral width를 적용하였다. 2D 1H-1H correlation spectroscopy (COSY) 스펙트럼은 relaxation delay를 2초로 설정하였으며, 32 스캔수, 각 차원에 대해서 7812.5 Hz spectral width를 적용하였다.

③ 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 확립

- Chenomx software program 내에 구축되어있는 대사체 library, HMDB web site 등을 이용하여 각 metabolite의 chemical shift, splitting pattern, integral, 예상 농도 정보 등을 matching 시킴으로서 농산물 (쌀겨) 시료 내에 함유된 대사체의 정성분석을 수행하였다. 또한 2D ¹H-¹H COSY 스펙트럼을 통해서 대사체 정성분석의 정확성을 높였다.
- 농산물 (쌀겨)을 ¹H NMR (600MHz)로 분석했을 때 총 21개의 대사체(1,3-dimethylurate, 4-hydroxybenzoate, acetate, alanine, betaine, choline, creatinine, formate, fumarate, glucitol, glucose, glutamine, glycine, inosine, N,N-dimethylglycine, pyruvate, trans-aconitate, uracil, uridine, valine, xylose)가 검출되었다 (그림 93). 1D NMR에서 검출된 대사체들의 정성분석의 신뢰성을 높이기 위해 ¹H-¹H COSY 분석을 수행하여 그림 94와 같이 스펙트럼으로 나타내었다. 표 42은 농산물(쌀겨) sample에 대한 대사체들의 ¹H NMR chemical shifts (δ) 및 splitting pattern을 나타낸 것이다.

④ 다변량 통계 분석을 이용한 농산물 (쌀겨) group 별 분리도 확인

- SIMCA-P+를 이용하여 다변량 통계 분석 방법 중 하나인 PCA를 실시한 결과, 열처리한 농산물(쌀겨) 시료와 열처리하지 않은 농산물 (쌀겨) 시료간의 분리도를 확인하였다. PCA 분석을 통해 열처리를 한 농산물 (쌀겨)와 열처리하지 않은 농산물 (쌀겨) 간의 대사체의 차이가 있음을 알 수 있었다 (그림 95).

표 42. ^1H NMR (600 MHz) 분석을 통해 검출된 농산물 (쌀겨) 내 대사체 목록

No.	compound	δH (multiplicity, J value; Moieties)	Assignment methods
1	valine	0.92 (d, $J=7.5$; CH_3), 1.03 (d, $J=7.4$; CH_3'), 2.20~2.30 (m; H-3)	1D, HH-COSY
2	alanine	1.41 (d, $J=7.13$; CH_3),	1D
3	acetate	1.94 (s; CH_3)	1D
4	glutamine	2.15~2.2 (m; H-3), 2.45~2.47 (m; H-4)	1D, HH-COSY
5	pyruvate	2.36 (s; CH_3)	1D
6	<i>N,N</i> -dimethylglycine	2.89 (s; H-3, H-4), 3.71 (s; H-2)	1D
7	creatinine	3.12 (s; CH_3), 4.19 (s; CH_2)	1D
8	choline	3.2 (s; H-3, H-4, H-5)	1D, HH-COSY
9	betaine	3.27 (s; H-3, H-4, H-5), 3.89 (s; H-2)	1D, HH-COSY
10	1,3-dimethylurate	3.30 (s; CH_3), 3.47 (s; CH_3)	1D
11	glucose	3.41~3.5 (m; H-4, H-5, H-2), 3.7~3.89 (m; H-3, H-5, H-6), 4.64 (d, $J=8.6$; H-1), 5.21 (d, $J=4.4$; H-1)	1D
12	xylose	3.41 (t, $J=7.3$; H-3), 3.53 (dd, $J=11.8$; H-5), 3.62~3.69 (m; H-3, H-4, H-5), 4.5 (d, $J=7.4$; H-1), 5.16 (d, $J=3.8$; H-1)	1D
13	glycine	3.59 (s; H-2)	1D
14	<i>trans</i> -aconitate	3.6 (s; H-2), 6.84 (s; H-4)	1D
15	glucitol	3.63~3.66 (m; H-1, H-4, H-6), 3.72~3.83 (m; H-2, H-3, H-5)	1D
16	uridine	4.12~4.15 (m; H-5'), 4.34 (dd, $J=5.9$; H-2'), 5.83 (d, $J=8.3$; H-5), 5.9 (d, $J=3.5$; H-1'), 7.74 (d, $J=7.8$; H-6)	1D
17	uracil	5.74 (d, $J=7.6$; H-5), 7.57 (d, $J=8.4$; H-6)	1D, HH-COSY
18	inosine	5.99 (d, $J=6.4$; H-1'), 8.18 (s; H-8), 8.19 (s; H-2)	1D
19	fumarate	6.54 (s; CH)	1D
20	4-hydroxybenzoate	6.91 (d, $J=8.2$; H-3, H-5), 7.82 (d, $J=8.6$; H-2, H-6)	1D, HH-COSY
21	formate	8.46 (s; CH)	1D

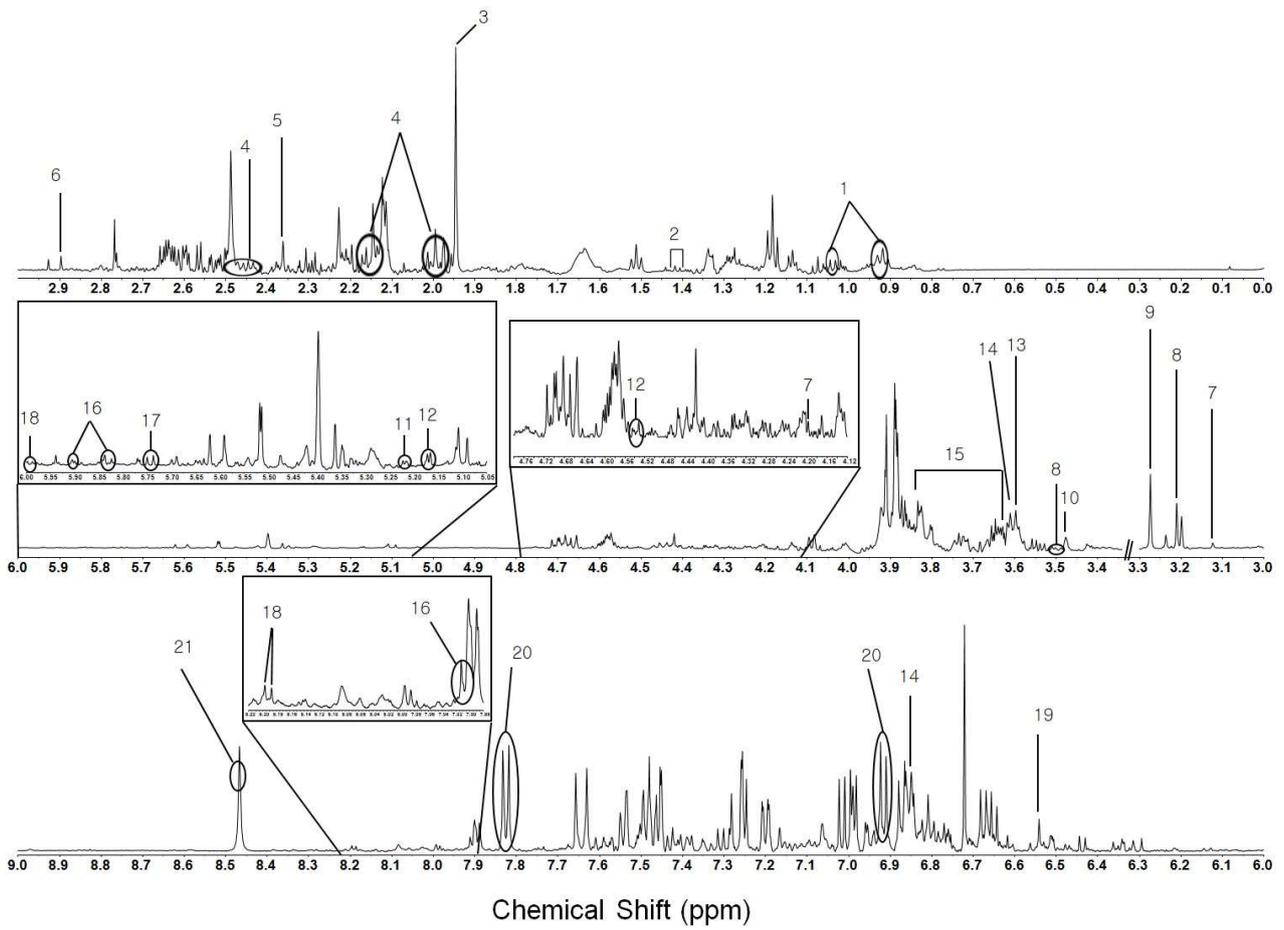


그림 93. 농산물 (쌀겨) sample에 대한 ^1H NMR spectrum. (각 물질 번호는 표 42 참고)

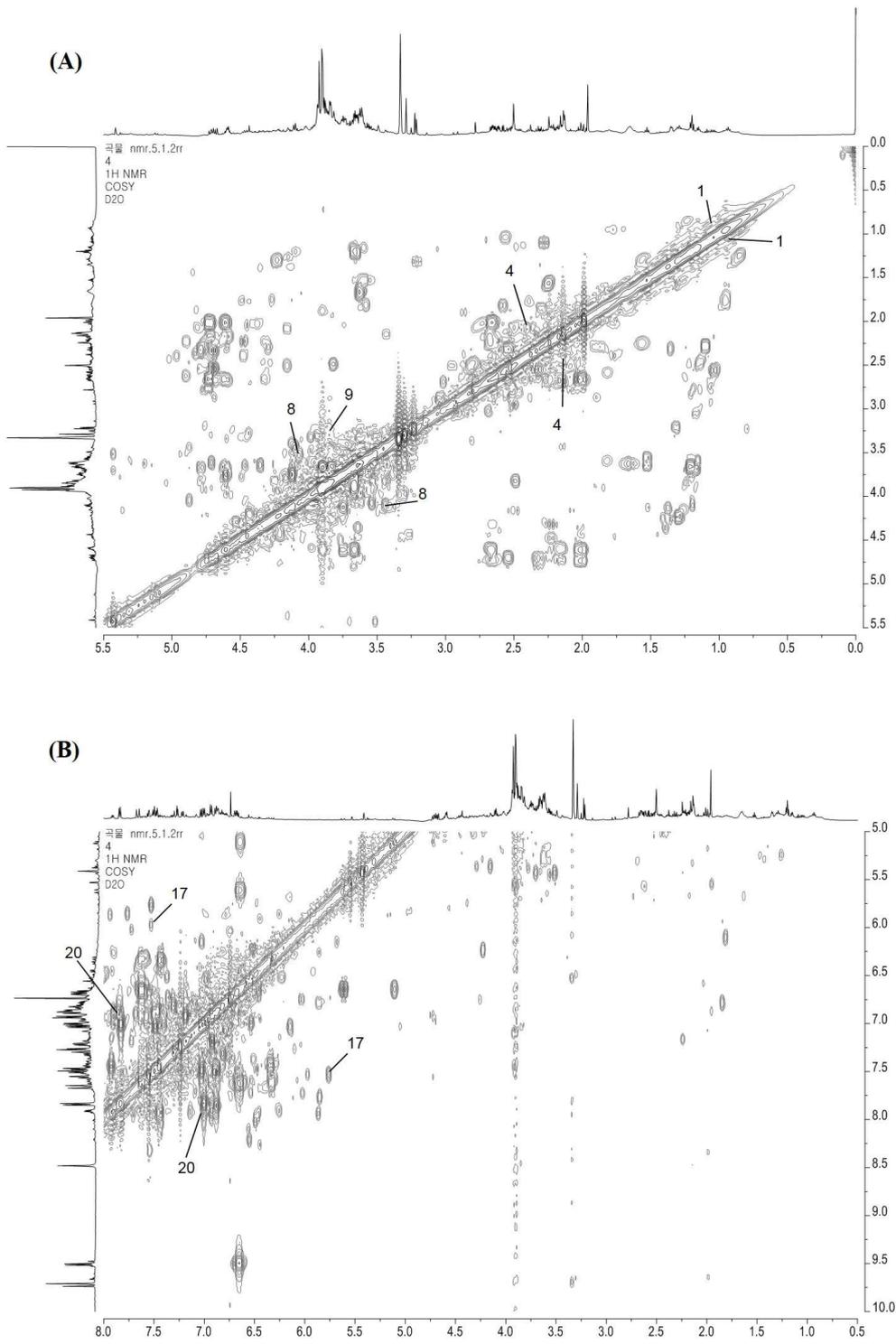


그림 94. 농산물(꿀겨) sample에 대한 ^1H - ^1H COSY spectrum. Chemical shift기준으로 (A) ^1H NMR spectra of 0.0-5.5 ppm, (B) ^1H NMR spectra of 5.0-10.0 ppm (각 물질 번호는 표 42 참고)

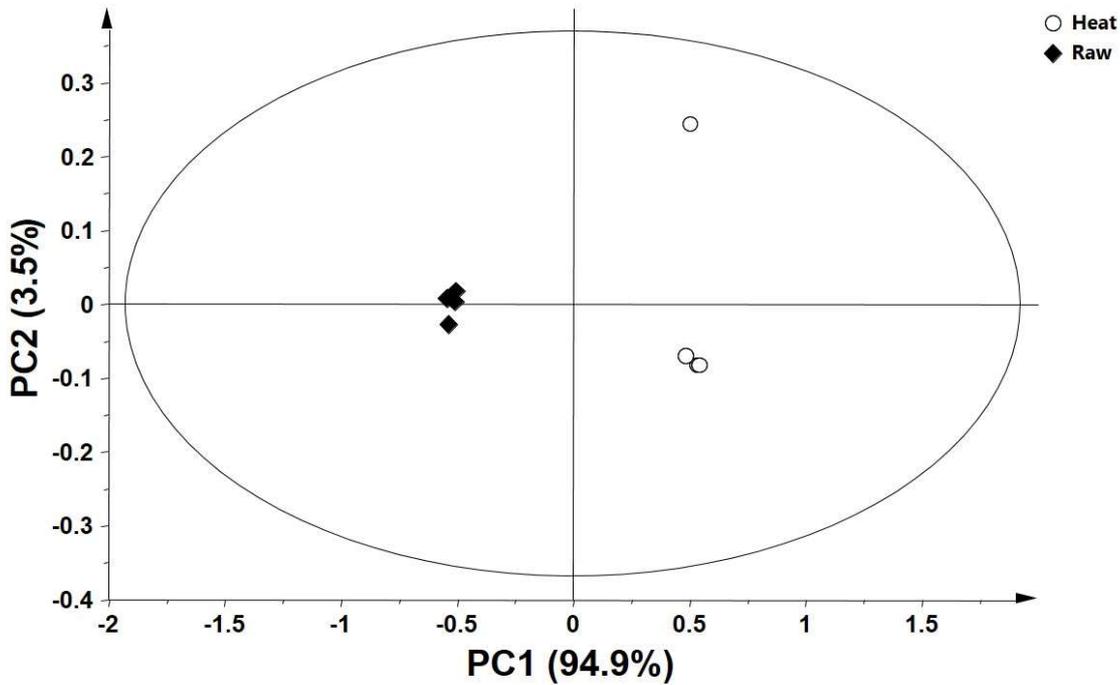


그림 95. 아무것도 처리하지 않은 농산물(쌀겨) sample과 열처리를 한 농산물(쌀겨) sample의 PCA score plot.

(2) 대두의 NMR 기반 대사체 지문 분석

(가) 샘플선정

- 한국과 중국산 대두 대사체 분석을 위해 한국산 8지역 (경기도 안성, 강원도 영월, 충청북도 음성, 충청남도 천안, 전라북도 임실, 전라남도 영광, 경상북도 의성 및 경상남도 거창), 중국산 9지역 (남동; 흑룡강성, 길림성, 랴오닝성, 중부; 허베이성, 산둥성, 후베이성, 남부; 저장성, 광둥성, 광서장족자치구) 생산 샘플을 사용하였다.

(나) 대두 유래 대사체 분석을 위한 시료 추출법의 최적화

- 당, 아미노산 지질 등의 다양한 대사체들이 추출될 수 있도록 MeOD, D₂O를 1:1의 비율로 섞은 용매를 이용하였다. NMR 측정 시 signal이 이동하는 것을 방지하기 위하여 D₂O에 인산칼륨을 첨가한 buffer 용액을 만들어 주고, 1 N NaOD를 첨가하여 D₂O의 pH를 6으로 조정하였다 (Kim et al. 2010). D₂O용매 안에 함유된 0.05% 3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP)는 내부표준물질로서 NMR shift의 calibration reference로서 사용하였다.

(다) NMR 가동조건 확립

- NMR spectrometer는 AVANCE 600 FT-NMR (600.13 MHz, Bruker사) 기기를 활용함. 대두 시료 추출물은 298 K (25 °C)에서 측정하였다. 1D ^1H -NMR에서는 pulse sequence로서 물 피크를 저하시키는 *zqpr* presaturation pulse sequence를 이용하였으며, relaxation delay는 1초, 128 스캔수, 9,615.4 Hz의 spectral width를 적용하였다. 2D ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY) 스펙트럼은 relaxation delay를 1.4초로 설정하였으며, 32 스캔수, 각 차원에 대해서 5,681.8 Hz spectral width를 적용하였다.

(라) 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 확립

- Chenomx software program 내에 구축되어 있는 대사체 library, HMDB web site 등을 이용하여 각 metabolite들의 정성 분석을 수행하였다. 또한, Mestrenova software program을 이용하여 대사체들의 chemical shift(δ), splitting pattern, integral, 예상 농도 정보 등을 matching 시킴으로서 대두 시료 내에 함유된 대사체의 정성분석을 수행하였다.
- 대두를 ^1H NMR (600MHz) 로 분석한 결과 총 25개의 대사체(2-hydroxyisobutyrate, 2-oxoglutarate, acetate, acetoacetate, alanine, asparagine, aspartate, choline, citrate, formate, fumarate, galactarate, glucose, glutamate, hypoxanthine, isoleucine, leucine, malonate, oxypurinol, raffinose/stachyose, succinate, sucrose, tartrate, tryptophan, valine)가 검출되었다 (표 43, 그림 96).
- 2D ^1H - ^1H COSY 스펙트럼을 통해 총 6개의 대사체, ^1H - ^{13}C HSQC 스펙트럼을 통해 총 20개의 1D NMR에서 검출된 대사체들 정성분석의 정확성을 높여주었다 (표 43, 그림 97).

(마) 다변량 통계 분석 실시

- SIMCA P+를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다.
- 원산지 판별을 위한 최적의 분리 및 예측 model을 찾기 위해 다양한 데이터 처리조건 (normalization, scaling 방법)을 비교하였다. 한국과 중국 원산지 판별을 위한 OPLS-DA model 설립의 최적조건으로는 permutation test를 통과하면서 가장 큰 R^2Y , Q^2Y 값을 보이는 total area normalization, UV scaling, 6 components로 지정한 모델이 선정되었다 (표 44). 해당 조건을 적용하여 설립한 OPLS-DA모델의 score plot상에서 한국과 중국샘플이 predictive component 1을 기준으로 뚜렷하게 분리되는 것을 확인하였다 (그림 98A).
- OPLS-DA모델의 over-fitting 방지 및 예측력 검증을 위해 leave-one-out cross validation을 수행하였다. 또한 모델의 classification performance를 테스트하기 위해 cross validation을 통해 도출된 각 샘플의 class 예측값을 토대로 모델의 민감도 (sensitivity), 특이도 (specificity), 및 정확도 (accuracy)를 산출하였다. 그 결과 한국과 중국산 대두분리 모델은 민감도, 특이도 및 정확도가 100%, 96.9%, 및 98.5%의 값을 나타냈다 (표 45, 그림 98B).
- 한국과 중국산 대두 원산지 분리에 기여하는 대사체 물질확인을 위해 VIP (variable influence on projection) 값을 분석하였고, VIP 1.0이상의 8개 대사체 (tartarate, galactarate, tryptophan, valine, raffinose/stachyose, isoleucine, citrate, alanine)가 잠재적 바이오마커 후보로 선정되었다 (표 46).

표 43. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) 분석을 통해 검출된 대두 (중국산) 내 대사체 목록

Compound	Chemical shift (multiplicity, J value)	Assignment method
2-hydroxyisobutyrate	1.34(s; H-3, H-4)	1D/HSQC
2-oxoglutarate	2.44(t, $J=6.93$; H-5), 2.99(t, $J=6.90$; H-4)	1D/HSQC
Acetate	1.91(s; H-2)	1D
Acetoacetate	2.28(s; H-4)	1D/HSQC
Alanine	1.47(d, $J=7.14$; H-3), 3.78(q, $J=7.24$; H-2)	1D/COSY/ HSQC
Asparagine	2.82-2.88(m; H-2), 2.90-2.98(m; H-2), 4.01(q, $J=4.26$; H-3)	1D/HSQC
Aspartate	2.62(dd, $J=8.7$; H-3), 2.79(dd, $J=3.78, 13.68$; H-3), 3.91(dd, $J=3.75,$ 4.92; H-2)	1D/COSY/ HSQC
Choline	3.20(s; H-3, H-4, H-5), 3.48-3.53(m; H-2), 4.03-4.09(m; H-1)	1D/ HSQC
Citrate	2.54(d, $J=14.46$; 2Ha, 4Ha), 2.68(d, $J=16.26$; 2Hb, 4Hb)	1D/HSQC
Formate	8.46(s; H-1)	1D
Fumarate	6.52(s; H-2, H-3)	1D
Galactarate	3.94(s; H-3, H-4), 4.26(s; H-2, H-5)	1D
Glucose	3.22(dd, $J=1.44, 7.95$; H-2), 3.38-3.43(m; H-4), 3.48(t, $J=9.18$; H-5), 3.52(dd, $J=3.7, 9.82$; H-2), 3.72(dd, $J=5.85, 6.48$; H-3, H-6), 3.80-3.85(m; H-5, H-6), 4.62(d, $J=7.92$; H-1), 5.22(d, $J=3.72$; H-1)	1D/HSQC
Glutamate	2.00-2.08(m; H-3), 2.10-2.18(m; H-3), 2.28-2.40(m; H-4), 3.75(dd, $J=4.8, 2.4$; H-2)	1D/ HSQC
Hypoxanthine	8.17(s; H-2), 8.20(s; H-8)	1D/HSQC
Isoleucine	0.93(t, $J=7.40$; H-5), 1.00(d, $J=6.90$; CH ₃), 1.41-1.49 (m; H-4), 1.92-2.01(m; H-3), 3.66(d, $J=4.08$; H-2)	1D/COSY/ HSQC
Leucine	0.94(t, $J=6.06$; H-5, CH ₃), 1.64-1.78(m; H-3, H-4), 3.69-3.76(m; H-2)	1D/HSQC
Malonate	3.13(s; H-2)	1D/HSQC
Oxypurinol	8.27(s; H-7)	1D/HSQC
Raffinose/Stachyose	3.52(t, $J=9.6$; H-4'), 3.69(br. s; H-6), 3.95(t, $J=6.36$; H-5'), 4.95(dd, $J=2.7, 4.1$; H-1'), 5.41(d, $J=3.84$; H-1)	1D/HSQC
Succinate	2.42(s; H-2, H-3)	1D/ HSQC
Sucrose	3.55(dd, $J=3.84, 6.12$; H-1'), 3.66(s; H-1), 3.75(t, $J=9.51$; H-3), 3.76-3.84(m; H-6), 4.04(t, $J=8.58$; H-4'), 5.39(d, $J=3.84$; H-1)	1D/COSY/ HSQC
Tartarate	4.34(s; H-2, H-3)	1D
Tryptophan	7.20-7.24(m; H-8), 7.18-7.28(m; H-9), 7.32(s; H-2), 7.71(d, $J=7.92$; H-7)	1D/COSY/ HSQC
Valine	0.98(d, $J=7.02$; CH ₃), 1.05(d, $J=7.14$; H-4), 2.20-2.32(m; H-3), 3.61(d, $J=4.33$; H-2)	1D/COSY/ HSQC

s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad.

표 44. 한국과 중국산 대두분리를 위한 다양한 normalization, scaling조건에 따른 OPLS-DA모델 parameter

Group No.	Normalization method	Scaling method	Number of component	R ² Y	Q ² Y	R ² Y intercept	Q ² Y intercept
1	Standard	UV	4	0.889	0.802	0.215	-0.511
2		Par	6	0.862	0.796	0.177	-0.691
3	Total	UV	6	0.905	0.818	0.260	-0.836
4		Par	6	0.877	0.815	0.182	-0.738

표 45. 대두 원산지 판별을 위한 OPLS-DA모델의 leave-one-out cross validation parameter

Class	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %
Korea vs China	100.0	96.9	98.5

표 46. 한국과 중국산 대두 대사체 분리에 기여하는 바이오마커 목록

No.	Compounds	VIP value
1	Tartarate	2.016
2	Galactarate	1.859
3	Tryptophan	1.703
4	Valine	1.643
5	Raffinose/Stachyose	1.624
6	Isoleucine	1.542
7	Citrate	1.360
8	Alanine	1.130
9	Choline	0.956
10	Asparagine	0.923
11	2-hydroxyisobutyrate	0.814
12	Oxypurinol	0.491
13	Succinate	0.439
14	Glutamate	0.418
15	2-oxoglutarate	0.409
16	Hypoxanthine	0.372
17	Aspartate	0.314
18	Sucrose	0.288
19	Formate	0.257
20	Fumarate	0.200
21	Leucine	0.198
22	Acetoacetate	0.161
23	Acetate	0.149
24	Malonate	0.142
25	Glucose	0.003

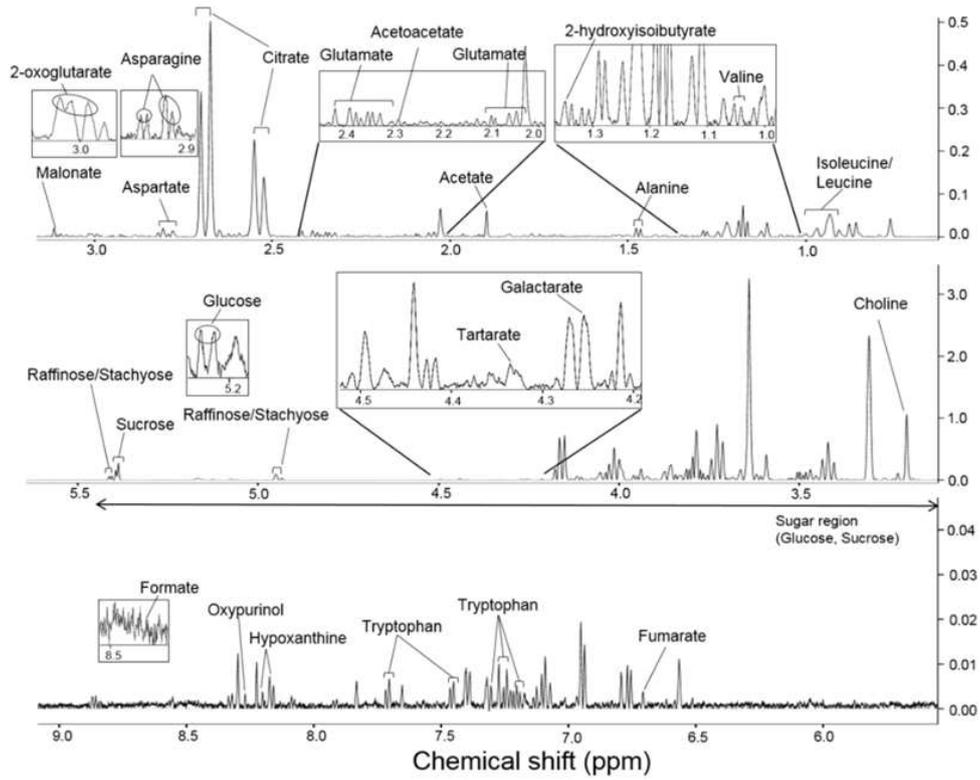


그림 96. 대두 sample (중국산)에 대한 ^1H -NMR spectrum

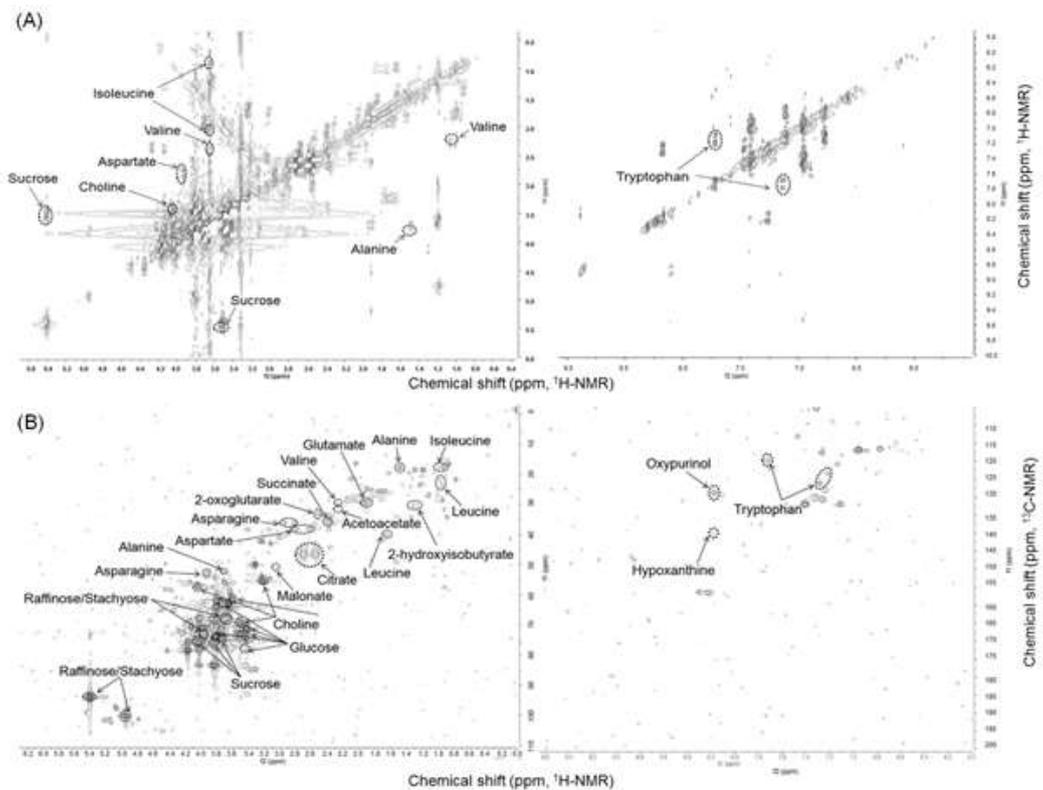


그림 97. 대두 sample (중국산)에 대한 2D-NMR spectrum. (A) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum

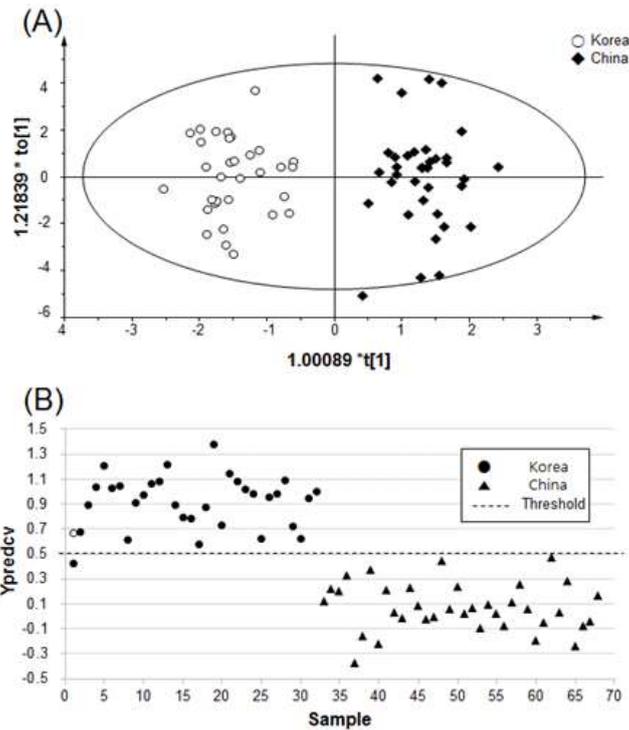


그림 98. 한국과 중국산 대두 원산지 분리 OPLS-DA모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation plot (B)

(3) 참깨의 NMR 및 FT-IR 기반 대사체 지문 분석

(가) NMR기반 대사체 분석

1. 샘플선정

- 한국과 중국산 참깨 대사체 분석을 위해 한국산 10지역 (경기도 파주/이천, 강원도 춘천/인제, 충청도 충주/당진, 전라도 익산/남원, 경상도 안동/진주), 중국산 6지역 (북동; 흑룡강성, 길림성, 중부; 허난성, 안후이성, 남부; 운난성, 광서장족자치구) 생산 샘플을 사용하였다.

② 참깨 유래 대사체 분석을 위한 시료 추출법의 최적화

- 참깨의 수용성 대사체 성분분석을 위해 Bligh & Dyer 분석법을 사용하였다 (Bligh et al., 1959). 동결건조된 참깨 0.10g에 cold mixture solvent (cold mixture (CHCl₃:MeOH:=1:1) 1.6 mL를 넣고 1분간 vortexing 하였다. Shaker에서 1시간 동안 교반 후 (4°C) 후 원심분리하여 상층액(hyrosoluble phase)을 채취하였다. 상층액을 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 후, 여과액을 (600 μL) 질소가스로 건조시키고, 건조가 완료되면 D₂O + KH₂PO₄ buffer in D₂O (pH 6.0) (7:3) 용액을 600 μL 넣어 재용해 하였다. 재용해 용액 600 μL를 NMR tube에 옮긴다. NMR 측정 시 signal이 이동하는 것을 방지하기 위하여 D₂O에 인산칼륨을 첨가한 buffer 용액을 만들어주고, 1 N NaOD를 첨가하여 D₂O의 pH를 6으로 조정하였다. MeOD용매 안에 함유된 0.05% 3-(tetramethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP)는 내부표준물질로서 NMR shift의 calibration reference로서 사용하였다.

③ NMR 가동조건 확립

- NMR spectrometer는 JNM-ECZ 600R (600.17 MHz, Jeol사) 기기를 활용함. 참깨 시료 추출물은 298 K (25 °C)에서 측정하였다. Pulse sequence로서 물 피크를 저하시키는 *zqpr* presaturation pulse sequence를 이용하였으며, relaxation delay는 5초, 128 스캔수, 9,024.4 Hz의 spectral width를 적용하였다.

④ 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 확립

- Chenomx software program 내에 구축되어있는 대사체 library, HMDB web site 등을 이용하여 각 metabolite들의 정성 분석을 수행하였다. 또한, Mestrenova software program을 이용하여 대사체들의 chemical shift(δ), splitting pattern, integral, 예상 농도 정보 등을 matching 시킴으로서 참깨 시료 내에 함유된 대사체의 정성분석을 수행하였다.
- 참깨를 ^1H NMR (600MHz) 로 분석한 결과 총 24개의 대사체(valerate, isoleucine, leucine, valine, threonine, alanine, acetate, proline, malate, succinate, asparagine, choline, betaine, glucose, xylose, glycine, ascorbate, sucrose, arabinose, uridine, tyrosine, gallate, phenylalanine, tryptophan)가 검출되었다 (표 47, 그림 99).
- 2D ^1H - ^1H COSY 스펙트럼을 통해 총 10개의 대사체, ^1H - ^{13}C HSQC 스펙트럼을 통해 총 4개의 1D NMR에서 검출된 대사체들 정성분석의 정확성을 높여주었다 (표 47, 그림 100).

⑤ 다변량 통계 분석 실시

- SIMCA P+를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다.
- 원산지 판별을 위한 최적의 분리 및 예측 model을 찾기 위해 다양한 데이터 처리조건(normalization, scaling 방법)을 비교하였다. 한국과 중국 원산지 판별을 위한 최적의 OPLS-DA model로서는 total area normalization, UV scaling, 5 components로 지정한 모델이 선정되었다 (표 48). 선정된 조건으로 설립한 OPLS-DA 모델 score plot상에서 한국과 중국 참깨는 predictive component 1을 기준으로 뚜렷하게 구별이 가능하였다 (그림 101A).
- OPLS-DA모델의 leave-one-out cross validation 및 민감도 (sensitivity), 특이도 (specificity), 및 정확도 (accuracy)를 산출하였다. 그 결과 한국과 중국산 참깨분리 모델은 민감도, 특이도 및 정확도가 95.8%, 95.0%, 및 95.3%의 값을 나타냈다 (표 49, 그림 101B).
- 한국과 중국산 참깨 원산지 분리에 기여하는 대사체 물질확인을 위한 VIP분석결과, VIP 1.0 이상의 6개 대사체 (tyrosine, acetate, phenylalanine, tryptophan, uridine, malate)가 잠재적 바이오마커 후보로 선정되었다 (표 50).

표 47. ¹H-NMR (600 MHz) 분석을 통해 검출된 참깨 (중국산) 내 대사체 목록

Compounds	Chemical shift (multiplicity, J value)	Assignment method
Valerate	0.87 (t, J = 7.2), 1.28-1.32 (m), 2.14 (t, J = 7.2)	1D
Isoleucine	0.94 (t, J = 7.2), 0.99 (d, J = 7.2)	1D, COSY
Leucine	0.96 (t, J = 6.0)	1D
Valine	0.96 (d, J = 6.6), 1.02 (d, J = 7.2), 3.60 (d, J = 4.2)	1D
Threonine	1.33 (d, J = 6.6), 3.60 (d, J = 4.8)	1D, COSY
Alanine	1.48 (d, J = 7.2), 3.79 (q, J = 7.2)	1D
Acetate	1.90 (s)	1D
Proline	2.01-2.07 (m), 2.00-2.07 (m), 2.29-2.37 (m)	1D
Malate	2.38 (dd, J = 14.4, 10.8), 2.67 (dd, J = 15.6, 3)	1D
Succinate	2.39 (s)	1D
Asparagine	2.92-2.98 (m)	1D, COSY
Choline	3.22 (s), 3.48-3.51 (m)	1D
Betaine	3.24 (s), 3.89 (s),	1D, COSY
Glucose	3.38-3.42 (m), 3.40-3.44 (m), 3.51-3.55 (dd, J = 10.2, 3.6), 3.82-3.86 (m)	1D, HSQC
Xylose	3.41(t, J = 9.0)	1D, COSY, HSQC
Glycine	3.55 (s)	1D
Ascorbate	3.70-3.76 (m)	1D
Sucrose	3.75 (t, J = 9.6), 3.79-3.84 (m), 3.81-3.85 (m), 3.82-3.87 (m), 4.02 (t, J = 8.4), 5.40 (d, J = 3.6)	1D, COSY, HSQC
Arabinose	3.77 (dd, J = 11.4, 3.6), 3.80 (dd), 4.00-4.04 (m)	1D, HSQC
Uridine	5.88 (d, J = 9.0), 5.89 (d, J = 4.8), 7.84 (d, J = 7.8)	1D, COSY
Tyrosine	6.88-6.91 (m), 7.15-7.18 (m)	1D, COSY
Gallate	7.03 (s)	1D
Phenylalanine	7.33 (d, J = 7.2), 7.35-7.40 (m),	1D, COSY
Tryptophan	7.15-7.19 (m), 7.32 (s), 7.53 (d, J = 7.8), 7.71 (d, J = 7.8)	1D, COSY

s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet

표 48. 한국과 중국산 참깨분리를 위한 다양한 normalization, scaling조건에 따른 OPLS-DA모델 parameter

Group No.	Normalization method	Scaling method	Component number	R ² Y	Q ² Y	R ² Y intercept	Q ² Y intercept
1	Standardized area	UV	3	0.672	0.509	0.118	-0.253
2		Par	2	0.541	0.375	0.055	-0.159
3	Total area	UV	5	0.870	0.773	0.237	-0.461
4		Par	5	0.834	0.751	0.178	-0.391

UV, unit variance, Par, pareto

표 49. 참깨 원산지 판별을 위한 OPLS-DA모델의 leave-one-out cross validation parameter

Class	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %
Korea vs China	95.8	95.0	95.3

표 50. 한국과 중국산 참깨 대사체 분리에 기여하는 바이오마커 목록

No.	Compounds	VIP value
1	tyrosine	1.78
2	acetate	1.69
3	phenylalanine	1.54
4	tryptophan	1.5
5	uridine	1.08
6	malate	1.07
7	sucrose	0.94
8	leucine	0.91
9	arabinose	0.9
10	threonine	0.89
11	alanine	0.88
12	proline	0.84
13	gallate	0.82
14	glucose	0.8
15	xylose	0.78
16	betaine	0.77
17	valine	0.77
18	choline	0.77
19	ascorbate	0.73
20	asparagine	0.72
21	valerate	0.71
22	isoleucine	0.68
23	succinate	0.53
24	glycine	0.50

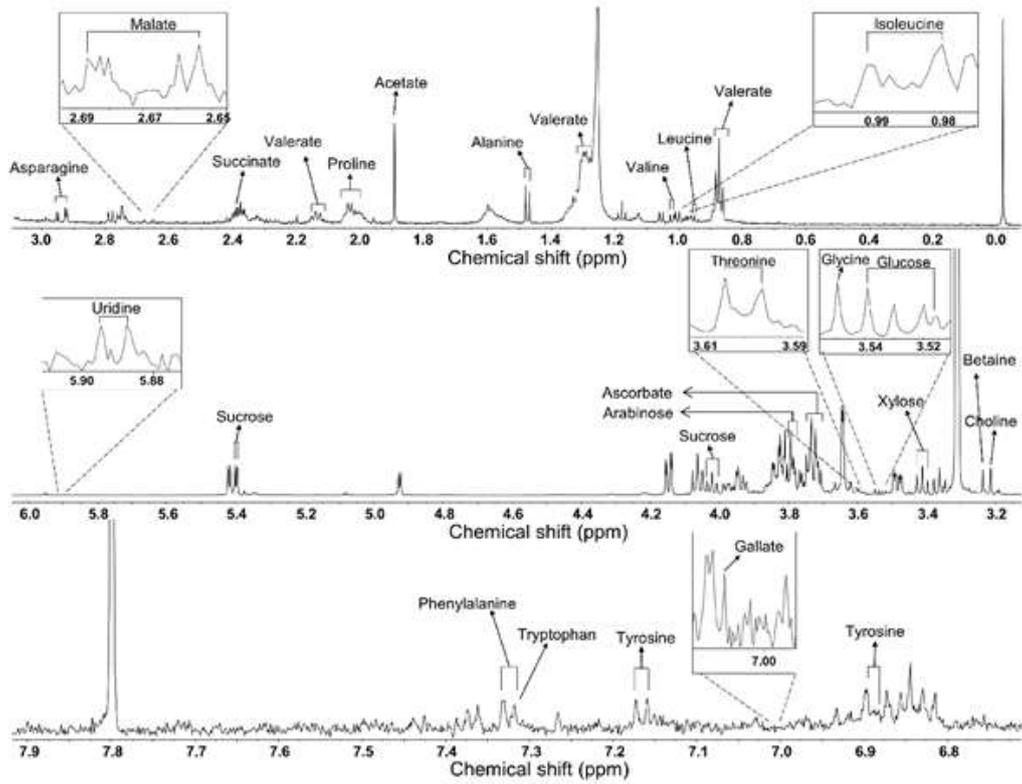


그림 99. 참깨 sample (중국산)에 대한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum

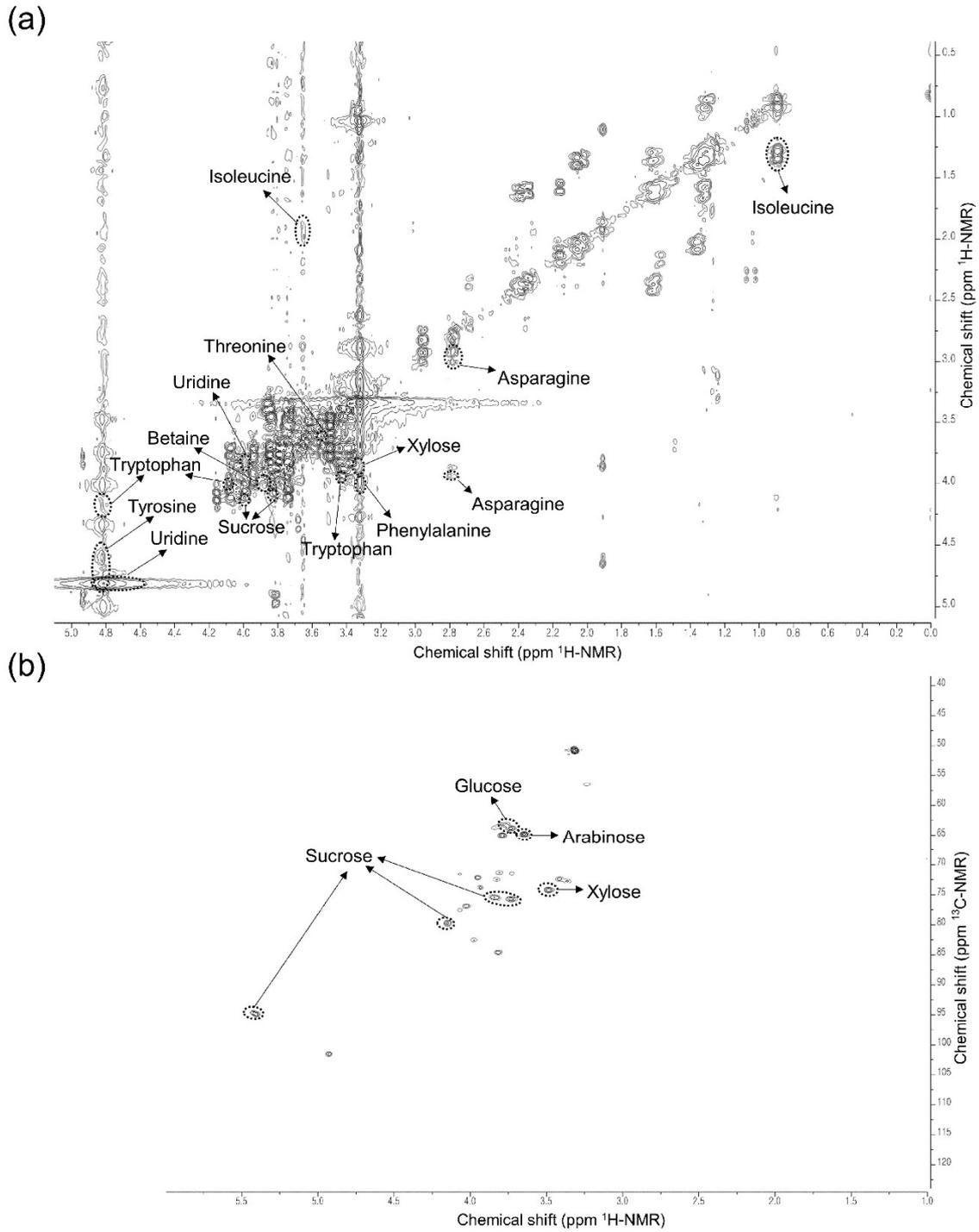


그림 100. 참깨 sample (한국산, 중국산 풀링)에 대한 2D-NMR spectrum. (A) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum

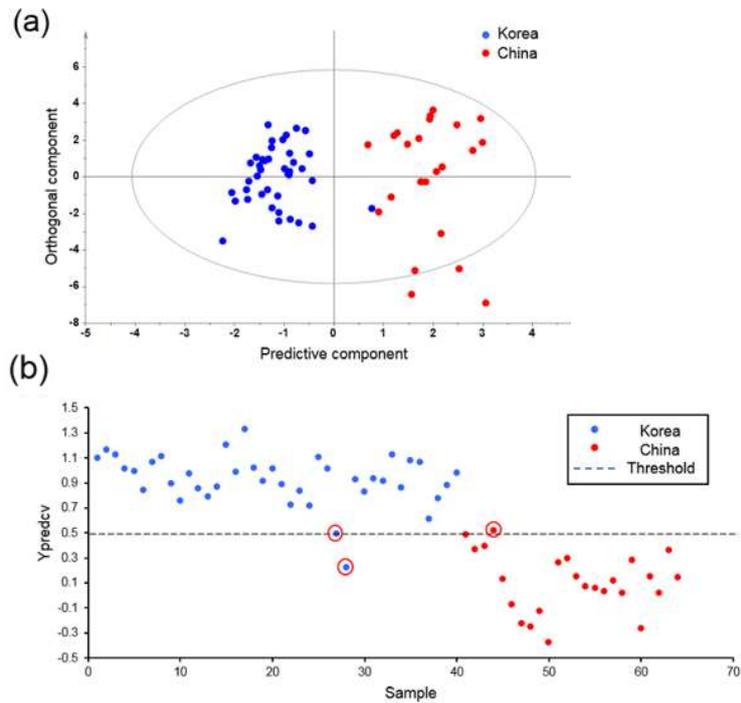


그림 101. 한국과 중국산 참깨 원산지 분리 OPLS-DA모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation plot (B)

(나) FT-IR기반 대사체 분석

① 샘플선정

- 참깨 내 대사체 분석을 위해 한국산 10지역 (경기도 이천/파주, 강원도 춘천/인제, 충청도 당진/충주, 전라도 무안/익산, 경상도 안동/진주), 중국산 6지역 (동북: 흑룡강성, 기림성, 중부: 하남성, 안후이성, 남부: 광서장족자치구, 운남성) 샘플을 사용하였다.

② 참깨 유래 대사체 분석을 위한 시료준비 및 FT-IR 분석조건

- FT-IR분석을 위해 대두샘플은 액체질소 동결, 분쇄 후 동결건조하였다.
- ATR mode를 적용함으로써 투과/반사법에 비해 샘플두께 제한이 없어 샘플 전처리를 간소화 하였으며, 견고한 재질인 diamond plate를 사용함으로써 분석의 재현성을 높임.
- Bruker사 기기(TENSOR27)를 활용하였고 scan수 32, 측정범위 $400\text{-}4,000\text{ cm}^{-1}$, resolution 4 cm^{-1} 을 적용함. 샘플분석 전 background scan을 측정하여 H_2O 와 CO_2 peak를 제거함으로써 background noise를 감소시키고 signal to ratio값을 증가시킴.

③ 대사체 identification 방법 및 데이터 전처리 작업

- Omnic program 내에 구축되어 있는 대사체 library, reference자료 등을 이용하여 각 피크들의 작용기를 분석하였고, 참깨시료에서 나타난 주요 대사체 작용기는 esters, amines, carboxylic acids, aromatics, phenols등이 나타났다. 작용기별로 ① C-H stretching region

(3,050-2,800 cm^{-1}), ② C=O stretching region (1,800-1,600 cm^{-1}), ③ C-O-C stretching and C-H bending region (1,600-650 cm^{-1})으로 구별이 가능했다 (그림 102).

- FT-IR데이터 전처리를 위해 다양한 normalization방법 (area, min-max, amide, vector (1차, 2차 미분))을 사용하였다.

④ 다변량 통계 분석 실시

- SIMCA P+를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다.

- 다변량 통계 분석 방법 중 하나인 PCA, PLS-DA, OPLS-DA를 이용하여 국내산과 중국산 참깨시료의 분리여부를 확인하였다. FT-IR spectrum의 전체영역 (4,000-400 cm^{-1})을 사용하였을 때 각 normalization방법별로 PCA와 PLS-DA분석 시 모델의 적합성과 예측력 지표, component value, score plot상 observations의 분리도 및 validation parameter의 부적합으로 인해 국내산과 중국산 참깨시료의 분리가 불충분함을 확인하였다 (그림 103). 따라서 작용기별 영역을 나누어 분석을 진행하였고, 그 결과 1번 작용기 영역 (C-H stretching region, 3,050-2,800 cm^{-1})에서 2차 미분 vector normalization사용 시 PCA, PLS-DA 및 OPLS-DA분석 결과 score plot상 분포도, PCA모델의 R^2X , Q^2X 값 (0.835, 0.549) 및 PLS-DA모델의 R^2Y , Q^2Y 값 (0.666, 0.554), permutation test 적합으로 인해 국내산과 중국산의 분리가 가능함을 확인하였다 (그림 104).

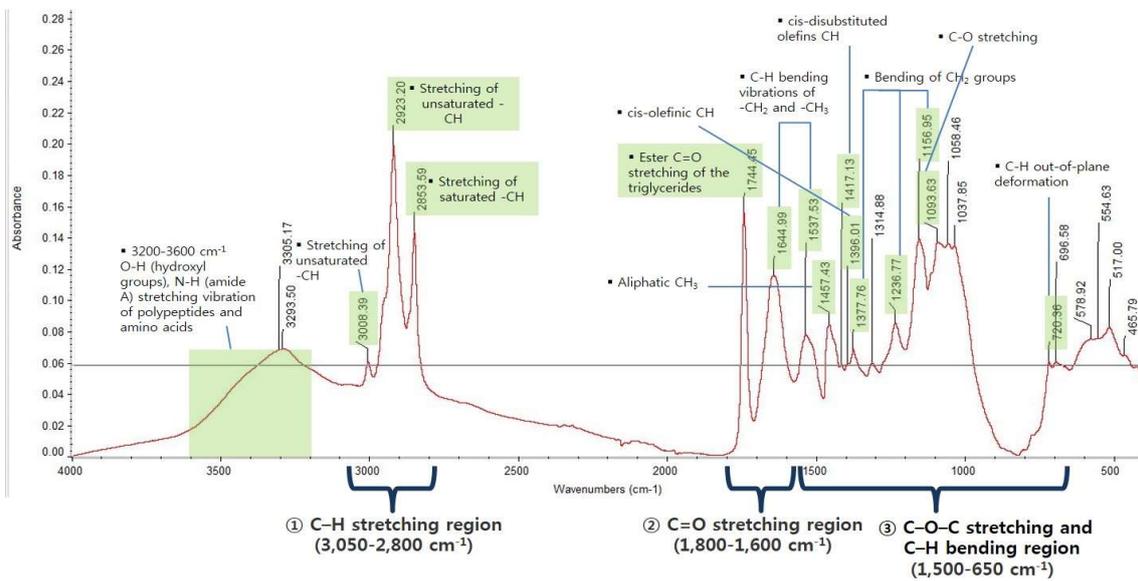


그림 102. 참깨 sample의 주요 대사체 작용기 identification

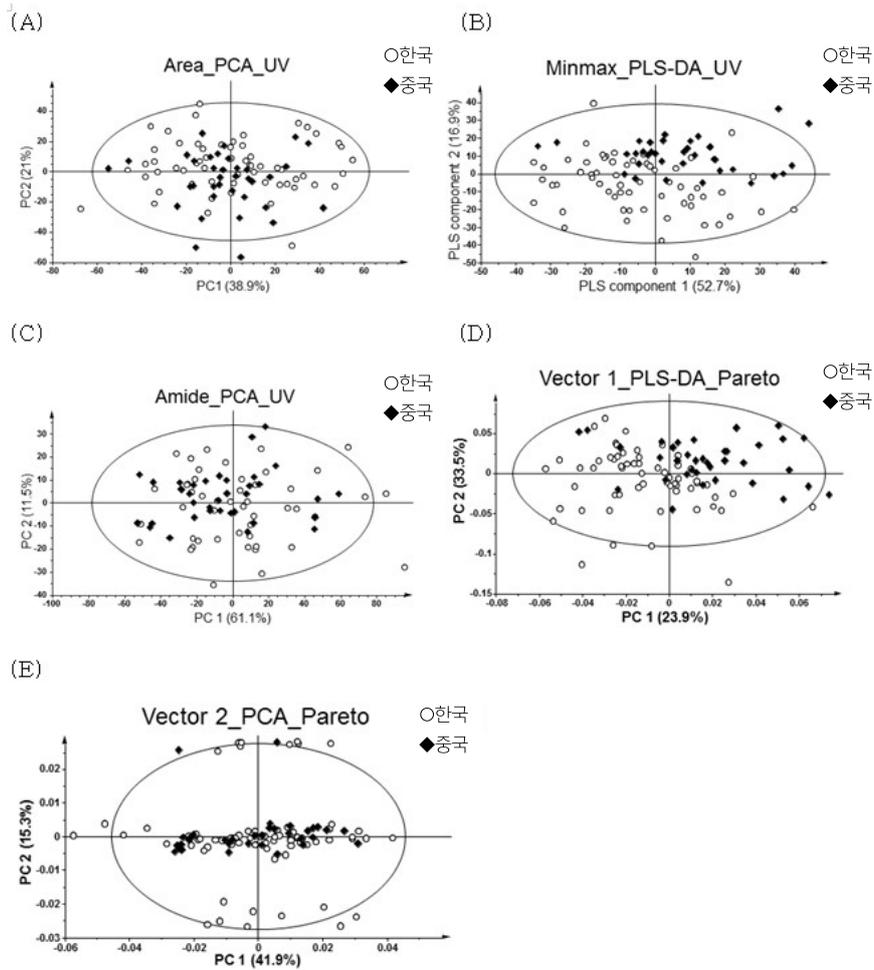


그림 103. 각 normalization방법 별 참깨 sample의 PCA 및 PLS-DA분석 score plot (FT-IR spectrum 전체영역 사용), (A) area normalization, (B) min-max normalization, (C) amide normalization, (D) vector 1차 normalization, (E) vector 2차 normalization

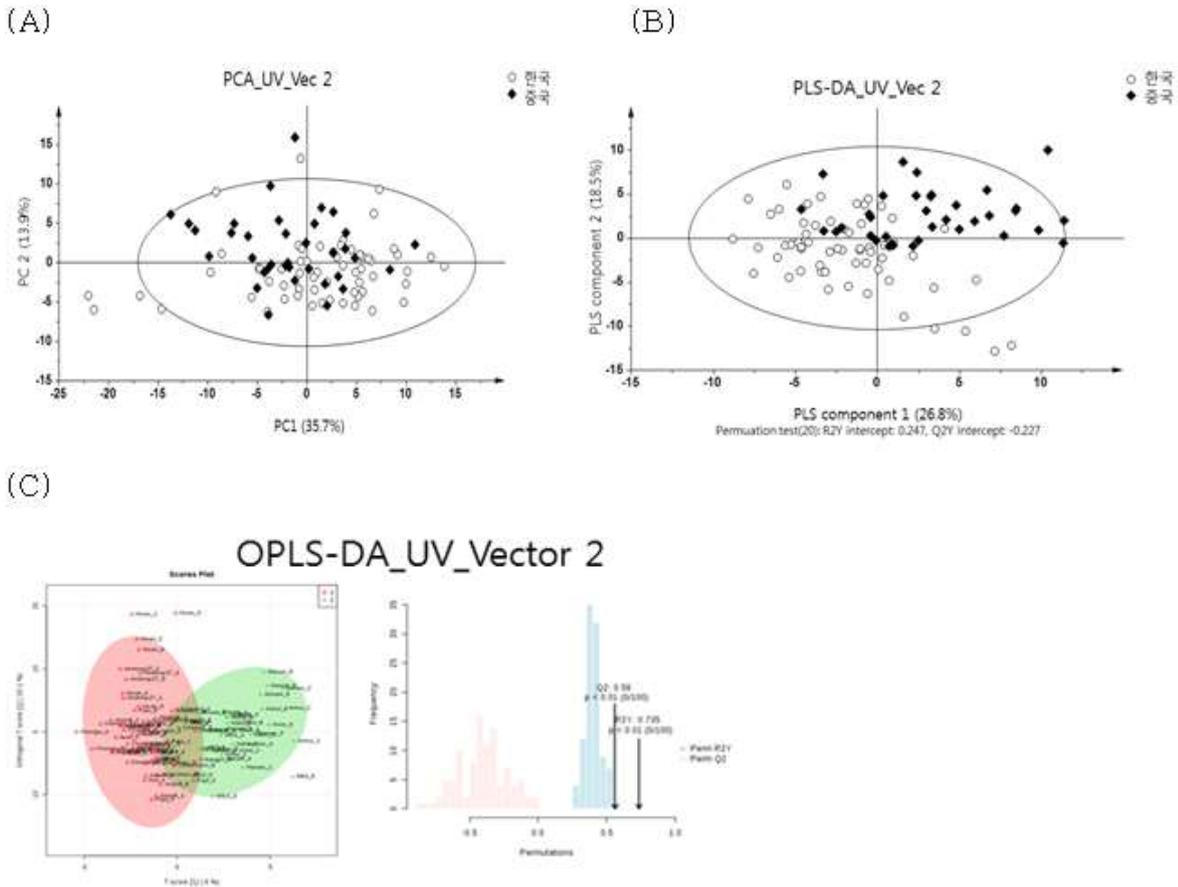


그림 104. 참깨 sample의 (A) PCA, (B) PLS-DA 및 (C) OPLS-DA 분석 score plot (FT-IR spectrum ①번 region (C-H stretching region, 3,050-2,800 cm⁻¹) 사용)

- 기존 국립농산물품질관리원에서 대두, 참깨 원산지 판별에 사용하는 방법은 근적외선분광분석기를 이용하여 분석하는 방법으로, 시료의 균질화 및 균분, 시료 칭량 10분, 기기의 diagnostic test 5분, blank test 5분, 기기분석 및 결과 통계분석 20분으로 총 40분 정도가 소요되었다. 반면, 본 연구과제에서 FT-IR을 이용해 확립한 방법은 전처리 시간 1분 30초, 분석시간 2분 데이터 변환, 전처리 및 다변량 통계분석 시간이 10~15분으로 원산지 판별 검사 시간이 총 20분 정도 소요된다. 따라서 FT-IR기반 농산물 원산지 판별 검사 수행시 기존 근적외선분광분석기 기반 검사보다 2배 정도의 시간을 단축시킬 수 있다. FT-IR 분석은 기존 분석 기술을 이용한 원산지 판별법과 달리 샘플 추출시간 생략이 가능하고 수 분 이내에 샘플 내 작용기 분석이 가능하기 때문에 신속하고 정확한 농산물 원산지 판별 검사에 활용 가능할 것으로 사료 된다.

(4) 쌀의 NMR 및 FT-IR 기반 대사체 지문 분석

(가) NMR기반 대사체 분석

① 샘플선정

- 한국과 중국산 쌀 대사체 분석을 위해 사용한 백미와 현미샘플은 표 51에 나타내었다.

② 쌀 유래 대사체 분석을 위한 시료 추출법의 최적화

- 쌀 대사체 분석을 위해 액체질소 동결 (10초) 후 분쇄하여 (50초) 사용하였다. 쌀 0.10g에 100% D₂O (0.1 mM TSP) 용액을 1.5 mL를 넣고 1분간 vortexing 하였다. 15분간 초음파 추출 후 원심분리하여 상층액을 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과하였다. 여과액 (600 μ L)를 NMR tube에 옮겨 분석하였다. NMR 측정 시 signal이 이동하는 것을 방지하기 위하여 D₂O에 인산칼륨을 첨가한 buffer 용액을 만들어주고, 1 N NaOD를 첨가하여 D₂O의 pH를 6으로 조정하였다. D₂O용매 안에 함유된 0.05% 3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP)는 내부표준물질로서 NMR shift의 calibration reference로서 사용하였다.

③ NMR 가동조건 확립

- NMR spectrometer는 AVANCE 600 FT-NMR (600.13 MHz, Bruker사) 기기를 활용하였다. 쌀 시료 추출물은 298 K (25 °C)에서 측정하였다. 1D ¹H-NMR에서는 pulse sequence로서 물 피크를 저하시키는 *zqr* presaturation pulse sequence를 이용하였으며, relaxation delay는 2초, 128 스캔수, 10,775.9 Hz의 spectral width를 적용하였다.

④ 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 확립

- Chemomx software program 내에 구축되어 있는 대사체 library, HMDB web site 등을 이용하여 각 metabolite들의 정성 분석을 수행하였다. 또한, Mestrenova software program을 이용하여 대사체들의 chemical shift(δ), splitting pattern, integral, 예상 농도 정보 등을 matching 시킴으로서 쌀 시료 내에 함유된 대사체의 정성분석을 수행하였다.
- 쌀샘플을 ¹H NMR (600MHz) 로 분석한 결과 총 24개의 대사체(4-aminobutyrate, acetate, alanine, asparagine, aspartate, choline, ethanol, fumarate, glucose, glutamate, glutamine, glycine, glycolate, isoleucine, leucine, malate, methionine, pyruvate, succinate, sucrose, threonate, threonine, valine)가 검출되었다 (표 52, 53, 그림 105).
- 2D ¹H-¹H COSY 스펙트럼을 통해 백미는 총 7개, 현미는 총 9개의 대사체, ¹H-¹³C HSQC 스펙트럼을 통해 백미는 총 6개, 현미는 7개의 1D NMR에서 검출된 대사체들 정성분석의 정확성을 높여주었다 (표 52, 53, 그림 106, 107).

⑤ 다변량 통계 분석 실시

- SIMCA P+를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다.
- 원산지 판별을 위한 최적의 분리 및 예측 model을 찾기 위해 다양한 데이터 처리조건 (normalization, scaling 방법)을 비교하였다. 한국과 중국 원산지 판별을 위한 최적의 OPLS-DA model로서는 백미는 total area normalization, UV scaling, 6 components, 현미는

standardized area normalization, UV scaling, 11 components로 지정한 모델이 선정되었다 (표 54). 선정된 조건으로 설립된 OPLS-DA모델의 score plot상에서 백미, 현미 모두 한국과 중국산 샘플이 predictive component 1을 기준으로 뚜렷하게 구분됨을 확인하였다 (그림 108A, 109A).

- OPLS-DA모델의 leave-one-out cross validation 및 민감도 (sensitivity), 특이도 (specificity), 및 정확도 (accuracy)를 산출하였다. 그 결과 한국과 중국산 쌀분리 모델은 백미의 경우 민감도, 특이도 및 정확도가 86.7%, 98.9%, 및 97.1%의 값을 나타냈고, 현미의 경우 민감도, 특이도 및 정확도가 97.8%, 100.0%, 및 98.9%의 값을 나타냈다 (표 55, 그림 108B, 109B).
- 한국과 중국산 쌀 원산지 분리에 기여하는 대사체 물질확인을 위한 VIP분석결과, 백미의 경우 VIP 1.0이상의 11개 대사체 (succinate, pyruvate, methionine, alanine, sucrose, fumarate, glutamine, aspartate, glucose, glutamate, glycolate)가 (표 56), 현미의 경우 VIP 1.0이상의 5개 대사체 (choline, glucose, maltose, sucrose, acetate)가 잠재적 바이오마커 후보로 선정되었다 (표 57).

표 51. 쌀 샘플 수집정보

생산국가	품종	지역(도/성)	도시	분석
백미				
한국	오대	강원도	철원, 춘천	NMR
		경기도	수원, 화성	
		충청도	청주	
		전라도	전주	
		경상도	상주	
	일품	강원도	춘천	
		경기도	수원, 화성	
		충청도	청주	
		전라도	전주	
		경상도	상주, 밀양, 예천	
	삼광	경기도	과주	
		경상도	경주	
		경기도	연천	
		강원도	횡성	
대안	경기도	연천		
운광	강원도	횡성		
맛드립	강원도	양양		
황금노들	충청도	청주		
새일미	충청도	서산		
	경상도	함안		
	전라도	김제		
신동진		해남		
	중국	정보없음	허강(hegang) 하얼빈(Haerbin) 신샹(Xinxiang) 후루다오(Huludao) 연변 조선족 자치주 (YanbianChaoxianzuzhizhou)	NMR, FT-IR
		후룡강 허난 랴오닝 길림		
현미				
한국	오대	강원도	철원, 춘천	NMR
		경기도	수원, 화성	
		충청도	청주	
		전라도	전주	
		경상도	상주	
	일품	강원도	춘천	
		경기도	수원, 화성	
		충청도	청주	
		전라도	전주	
		경상도	상주, 밀양	
중국	정보없음	후룡강	허강(hegang) 황야산(shuangyashan) 자무쓰(Jiamusi) 하얼빈(Haerbin)	NMR, FT-IR
		랴오닝	후루다오(Huludao)	NMR
		허난	난양(Nanyang) 신샹(Xinxiang) 상구(Shangqiu)	NMR, FT-IR
		장쑤	타이저우(taizhou)	NMR, FT-IR
		산둥	짜오좡(Zaozhuang) 린이(Linyi) 태안(Taian)	NMR
		산서	창지(changzhi)	NMR
		호북(후베이)	황강(Huanggang)	NMR, FT-IR
		쓰촨	난충(Nanchong)	NMR, FT-IR

표 52. ¹H-NMR (600 MHz) 분석을 통해 검출된 백미 (한국산) 내 대사체 목록

Compound	Chemical shift (multiplicity, J value)	Assignment method
4-Aminobutyrate	1.84-1.92 (m), 2.29 (t, J=7.4), 3.00 (t, J=7.2)	1D
Acetate	1.91 (s)	1D
Alanine	1.47(d, J=7.2)	1D
Asparagine	2.80-2.92(m), 2.88-3.00(m)	1D
Aspartate	2.80 (dd, J=17.4, 3.9)	1D, COSY
Choline	3.19 (s)	1D, HSQC
Ethanol	1.17 (t, J=7.2)	1D
Fumarate	6.51 (s)	1D
Glucose	4.63 (d, J=7.8), 5.22 (d, J=3.6)	1D, HSQC
Glutamate	2.00-2.10 (m)	1D, COSY
Glutamine	2.06-2.20 (m), 2.38-2.50 (m)	1D
Glycine	3.56 (s)	1D
Glycolate	3.95 (s)	1D
Isoleucine	0.92 (t, J=7.2), 1.00 (d, J=7.2)	1D, HSQC
Leucine	0.95 (t, J=6.2)	1D
Malate	4.33 (d, J=7.8)	1D, COSY
Maltose	5.39 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Methionine	2.66 (t, J=7.8)	1D, COSY
Pyruvate	2.36 (s)	1D
Succinate	2.42 (s)	1D
Sucrose	3.46 (t, J=9.6), 3.67 (s), 3.75 (t, J=9.6), 4.04 (t, J=8.6), 4.21 (d, J=8.7), 5.41 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Threonate	4.00 (d, J=2.4)	1D, HSQC
Threonine	1.31 (d, J=6.6)	1D, COSY
Valine	0.98 (d, J=6.9), 1.03 (d, J=6.6)	1D

s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet

표 53. ¹H-NMR(600 MHz) 분석을 통해 검출된 현미 (한국산) 내 대사체

Compound	Chemical shift (multiplicity, J value)	Assignment method
4-Aminobutyrate	1.84-1.92 (m), 2.29 (t, J=7.4), 3.00 (t, J=7.2)	1D, HSQC
Acetate	1.91 (s)	1D
Alanine	1.47(d, J=7.2)	1D
Asparagine	2.80-2.92(m), 2.88-3.00(m)	1D
Aspartate	2.80 (dd, J=17.4, 3.9)	1D
Choline	3.19 (s)	1D, HSQC
Ethanol	1.17 (t, J=7.2)	1D
Fumarate	6.51 (s)	1D
Glucose	4.63 (d, J=7.8), 5.22 (d, J=3.6)	1D, HSQC
Glutamate	2.00-2.10 (m)	1D, COSY
Glutamine	2.06-2.20 (m), 2.38-2.50 (m)	1D
Glycine	3.56 (s)	1D
Glycolate	3.95 (s)	1D
Isoleucine	0.92 (t, J=7.2), 1.00 (d, J=7.2)	1D, COSY, HSQC
Leucine	0.95 (t, J=6.2)	1D, COSY
Malate	4.33 (d, J=7.8)	1D, COSY
Maltose	5.39 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Methionine	2.66 (t, J=7.8)	1D, COSY
Pyruvate	2.36 (s)	1D
Succinate	2.42 (s)	1D
Sucrose	3.46 (t, J=9.6), 3.67 (s), 3.75 (t, J=9.6), 4.04 (t, J=8.6), 4.21 (d, J=8.7), 5.41 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Threonate	4.00 (d, J=2.4)	1D, HSQC
Threonine	1.31 (d, J=6.6)	1D, COSY
Valine	0.98 (d, J=6.9), 1.03 (d, J=6.6)	1D, COSY

s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet

표 54. 한국과 중국산 쌀분리를 위한 다양한 normalization, scaling조건에 따른 OPLS-DA모델 parameter

Group No.	Normalization method	Scaling method	Component number	R ² Y	Q ² Y	R ² Y intercept	Q ² Y intercept
백미							
1	Standardized area	UV	2	0.396	0.060	0.028	-0.152
2		Par	-	-	-	-	-
3	Total area	UV	6	0.727	0.582	0.113	-0.294
4		Par	7	0.721	0.572	0.112	-0.269
현미							
1	Standardized area	UV	11	0.882	0.799	0.188	-0.447
2		Par	8	0.820	0.706	0.168	-0.334
3	Total area	UV	10	0.879	0.783	0.177	-0.441
4		Par	9	0.808	0.677	0.175	-0.366

UV, unit variance, Par, pareto

표 55. 쌀 원산지 판별을 위한 OPLS-DA모델의 leave-one-out cross validation parameter

Class	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %
백미			
한국 vs 중국	86.7	98.9	97.1
현미			
한국 vs 중국	97.8	100.0	98.9

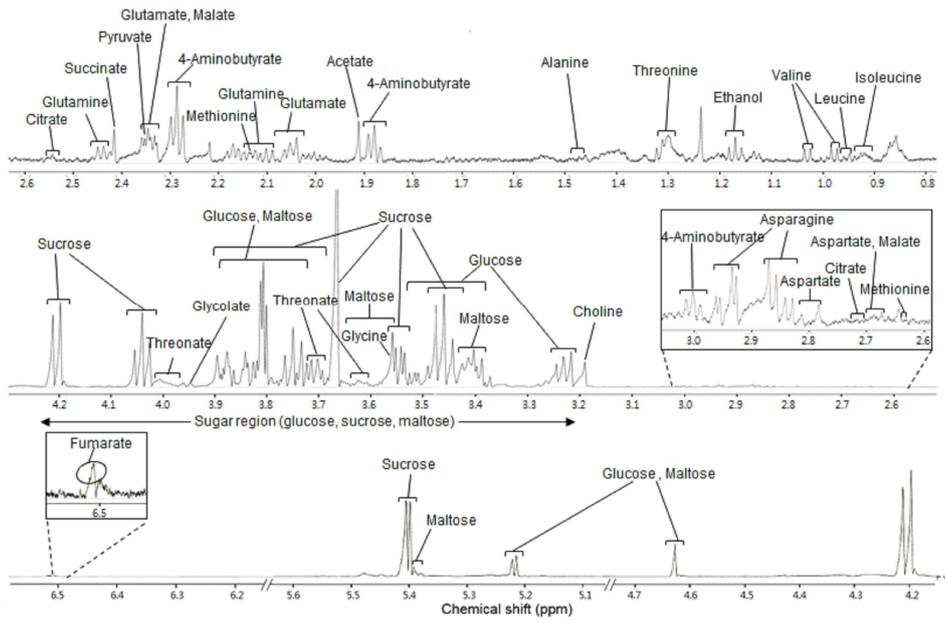
표 56. 한국과 중국산 쌀(백미) 대사체 분리에 기여하는 바이오마커 목록

No.	Compounds	VIP value
1	Succinate	1.554
2	Pyruvate	1.534
3	Methionine	1.482
4	Alanine	1.377
5	Sucrose	1.369
6	Fumarate	1.320
7	Glutamine	1.277
8	Asparate	1.237
9	Glucose	1.210
10	Glutamate	1.108
11	Glycolate	1.080
12	Threonine	0.998
13	Asparagine	0.984
14	4-Aminobutyrate	0.867
15	Valine	0.707
16	Maltose	0.637
17	Malate	0.560
18	Isoleucine	0.478
19	Glycine	0.428
20	Leucine	0.276
21	Ethanol	0.262
22	Choline	0.088
23	Acetate	0.063
24	Threonate	0.045

표 57. 한국과 중국산 쌀(현미) 대사체 분리에 기여하는 바이오마커 목록

No.	Compounds	VIP value
1	Choline	2.153
2	Glucose	2.120
3	Maltose	1.984
4	Sucrose	1.909
5	Acetate	1.163
6	Fumarate	0.925
7	Alanine	0.878
8	Ethanol	0.809
9	Glycine	0.720
10	Pyruvate	0.708
11	Glutamine	0.638
12	Threonate	0.631
13	4-Aminobutyrate	0.611
14	Succinate	0.608
15	Glutamate	0.593
16	Isoleucine	0.584
17	Methionine	0.408
18	Leucine	0.372
19	Malate	0.195
20	Threonine	0.152
21	Valine	0.132
22	Glycolate	0.078
23	Asparagine	0.040
24	Asparate	0.006

(A)



(B)

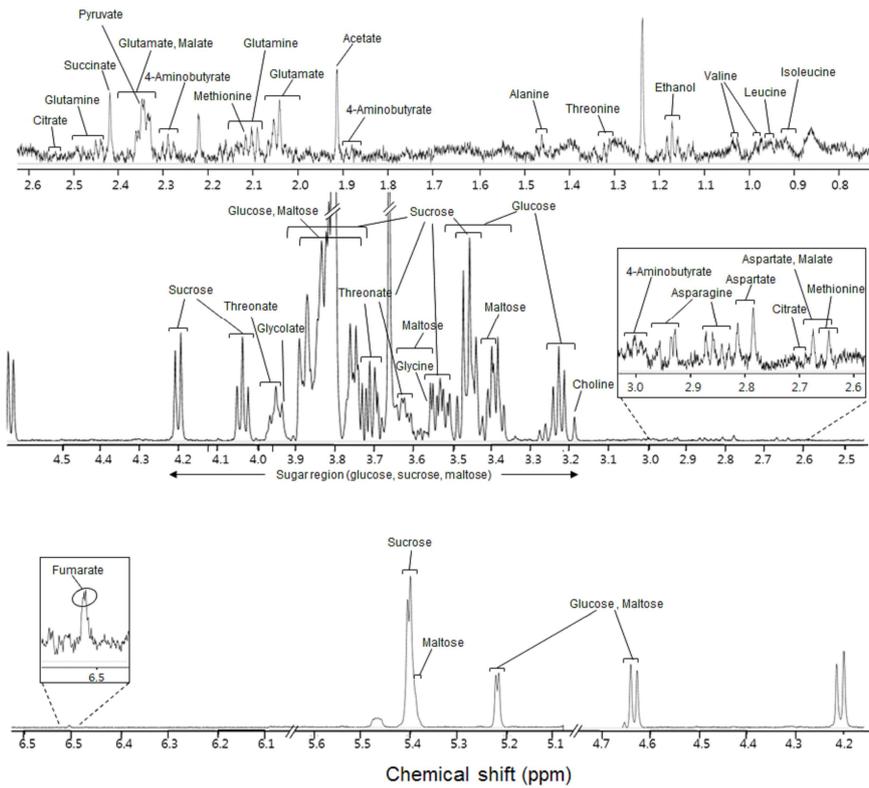


그림 105. 쌀 sample (한국산)에 대한 ^1H -NMR spectrum. (A) 현미, (B) 백미

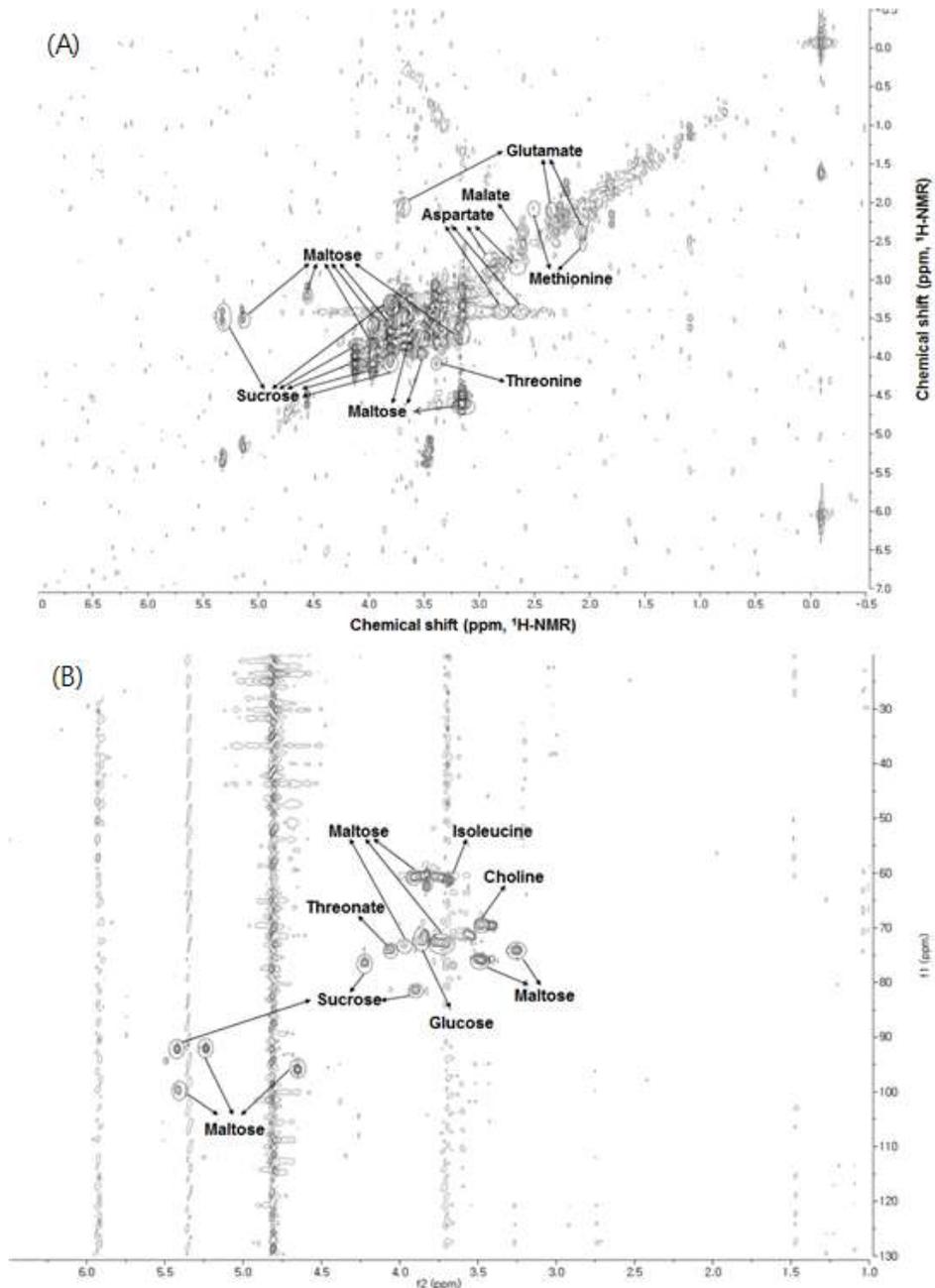


그림 106. 백미 sample (한국산, 중국산 풀링)에 대한 2D-NMR spectrum. (A) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum

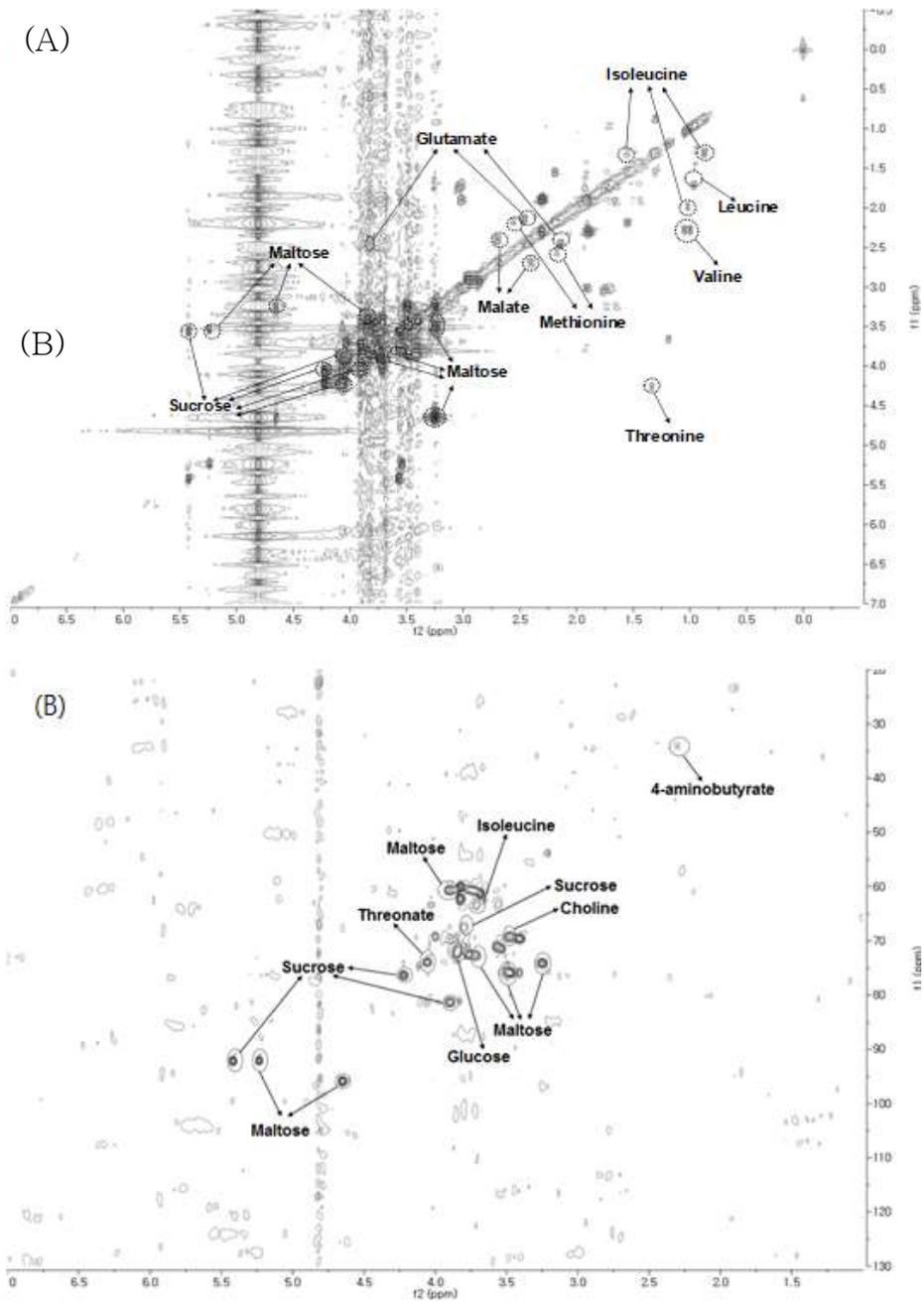


그림 107. 현미 sample (한국산, 중국산 풀링)에 대한 2D-NMR spectrum. (A) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum

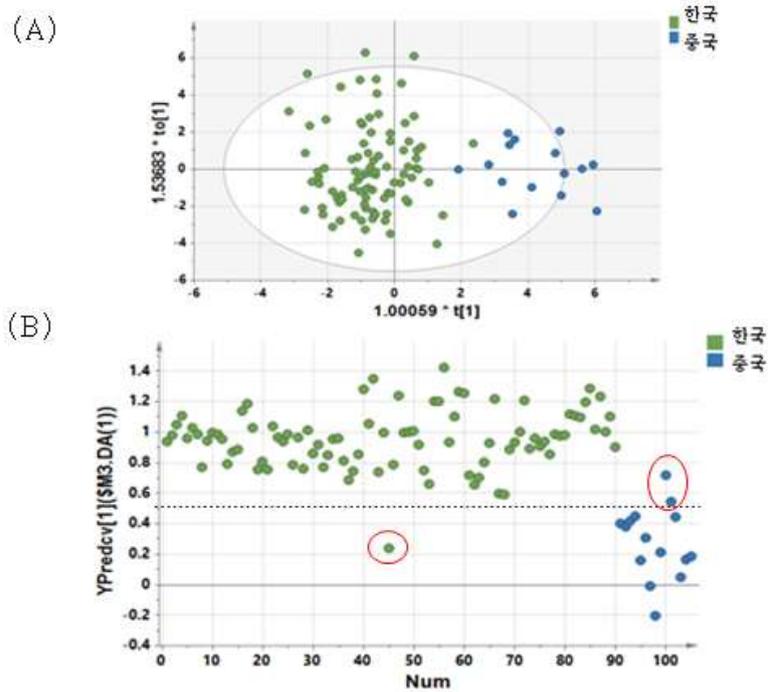


그림 108. 한국과 중국산 쌀 (백미) 원산지 분리 OPLS-DA모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation plot (B)

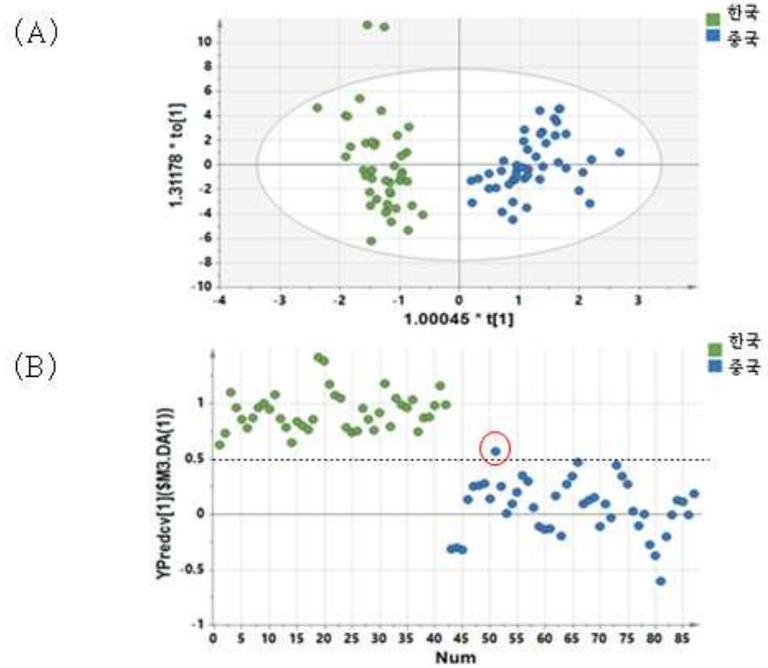


그림 109. 한국과 중국산 쌀 (현미) 원산지 분리 OPLS-DA모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation plot (B)

(나) FT-IR기반 대사체 분석

① 샘플선정

- 한국과 중국산 쌀 대사체 분석을 위해 사용한 백미와 현미샘플은 표 51에 나타내었다.

② 쌀 유래 대사체 분석을 위한 시료준비 및 FT-IR 분석조건

- FT-IR분석을 위해 쌀샘플은 액체질소 동결, 분쇄 후 사용하였다.
- ATR mode를 적용함으로써 투과/반사법에 비해 샘플두께 제한이 없어 샘플 전처리를 간소화 하였으며, 견고한 재질인 diamond plate를 사용함으로써 분석의 재현성을 높임.
- Bruker사 기기(TENSOR27)를 활용하였고 scan수 32, 측정범위 $400\text{--}4,000\text{ cm}^{-1}$, resolution 4 cm^{-1} 을 적용함. 샘플분석 전 background scan을 측정하여 H₂O와 CO₂ peak를 제거함으로써 background noise를 감소시키고 signal to ratio값을 증가시킴.

③ 대사체 identification 방법 및 데이터 전처리 작업

- Omnic program 내에 구축되어 있는 대사체 library, reference자료 등을 이용하여 각 피크들의 작용기를 분석하였고, 쌀시료에서 나타난 주요 대사체 작용기는 N-H stretching (protein, amide A), CH and CH₂ aliphatic stretching group (lipid - carbohydrate), C=O stretching (protein, amide D), C—O (carbohydrate), C—O stretching C—O—C/C—O bending 등이 나타났다 (표 58, 그림 110).
- FT-IR데이터 전처리를 위해 다양한 normalization방법 (area, min-max, amide, vector (1차, 2차 미분))을 사용하였다.

④ 다변량 통계 분석 실시

- SIMCA P+를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다.
- 다변량 통계 분석 방법 중 하나인 PCA, PLS-DA를 이용하여 국내산과 중국산 쌀시료의 분리 여부를 확인하였다. FT-IR spectrum의 전체영역 ($4,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)을 사용하였을 때 각 normalization방법별로 PCA, PLS-DA분석 시 모델의 적합성과 예측력 지표, component value, score plot상 observations의 분리도 및 validation parameter의 적합성을 확인하였다. 그 결과 백미와 현미샘플 모두에서 vector 1차 미분 normalization을 했을 때 PLS-DA모델의 R²Y, Q²Y 값 (백미 0.729, 0.638/현미 0.879, 0.721), permutation test 적합으로 인해 국내산과 중국산의 분리가 가능함을 확인하였다 (표 59, 그림 111, 112).

표 58. 쌀 sample (현미, 백미, 한국산)의 FT-IR 주요 대사체 작용기 assignment

Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional group	Reference
4000-3500	O-H stretching (H ₂ O)	Bruun et al. (2006)
3328-3325	N-H stretching (protein, amide A)	Kong et al. (2007)
2928-2926	CH and CH ₂ aliphatic stretching group (lipid - carbohydrate)	Murdock et al. (2009)
2856	CH ₂ symmetric stretching (lipid, protein)	Murdock et al. (2009)
2400-2200	O-C-O stretching (CO ₂)	Bruun et al. (2006)
2116-2113	C=C Stretching bond of alkynes molecule	Deepashreet al. (2012)
1743	C=O stretching (fatty acid group)	Murdock et al. (2009)
1644-1643	C=O stretching (protein, amide D)	Murdock et al. (2009)
1545-1544	N-H (protein amide II) bending, C-N stretching	Kong et al. (2007)
1417-1416	Aromatic C=C stretching vibrations	Dashtban et al. (2013)
1364-1341	CH and CH ₂ aliphatic bending group	Mecozzi et al. (2012)
1243	C-N Amide III band	Kong et al. (2007)
1150	C-O-C (carbohydrate, polysaccharides)	Duygu et al. (1833)
1079	C-O (carbohydrate)	Mecozzi et al. (2012)
1014-1013	C-O stretching C-O-C/C-O bending	Lammers et al. (2009)
929	CH out of plane bending (carbohydrate)	Gonzalez-Peña et al. (2010)
800-600	O-C-O bending (CO ₂)	Bruun et al. (2006)

표 59. 쌀 sample에 대한 FT-IR데이터 normalization방법 별 PLS-DA 모델지표

Normalization methods	Scaling	Component	R ² Y	Q ² Y	R ² Y intercept	Q ² Y intercept
백미						
Area	UV	2	0.516	0.495	0.0127	-0.111
	Par	4	0.61	0.554	0.0437	-0.17
Min-max	UV	2	0.505	0.479	0.013	-0.125
	Par	4	0.651	0.574	0.0397	-0.269
Amide	UV	3	0.502	0.446	0.0216	-0.164
	Par	3	0.531	0.472	0.0362	-0.127
Vector (1 st)	UV	6	0.954	0.818	0.469	-0.64
	Par	4	0.729	0.638	0.149	-0.364
Vector (2 nd)	UV	5	0.966	0.866	0.541	-0.511
	Par	8	0.96	0.834	0.56	-0.657
현미						
Area	UV	3	0.597	0.505	0.0153	-0.171
	Par	6	0.786	0.58	0.0864	-0.352
Min-max	UV	6	0.821	0.724	0.0824	-0.46
	Par	8	0.849	0.723	0.154	-0.669
Amide	UV	5	0.726	0.606	0.0888	-0.332
	Par	8	0.821	0.641	0.168	-0.619
Vector (1 st)	UV	5	0.951	0.797	0.483	-0.318
	Par	6	0.879	0.721	0.151	-0.415
Vector (2 nd)	UV	5	0.966	0.921	0.695	-0.16
	Par	4	0.827	0.728	0.0841	-0.231

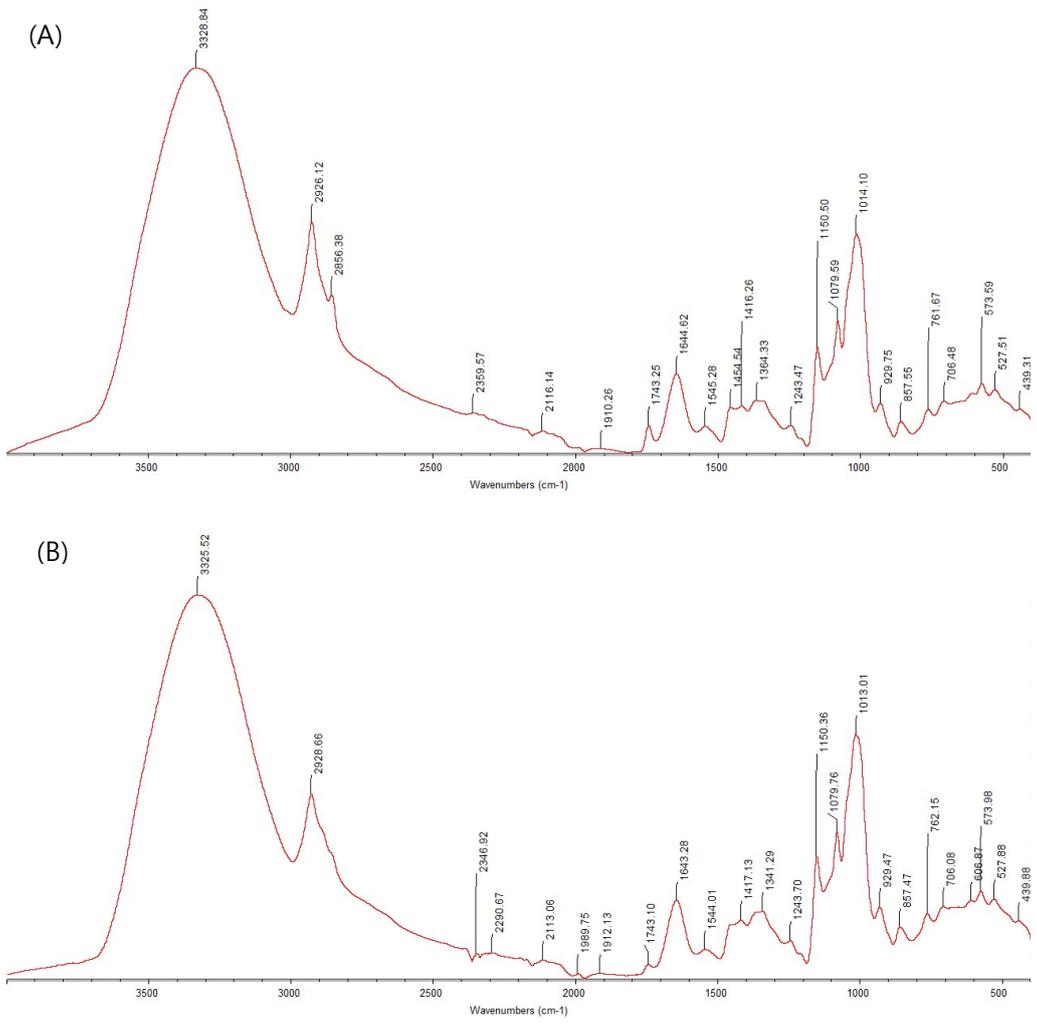


그림 110. 쌀 sample (한국산, A: 현미, B: 백미)에 대한 FT-IR spectrum

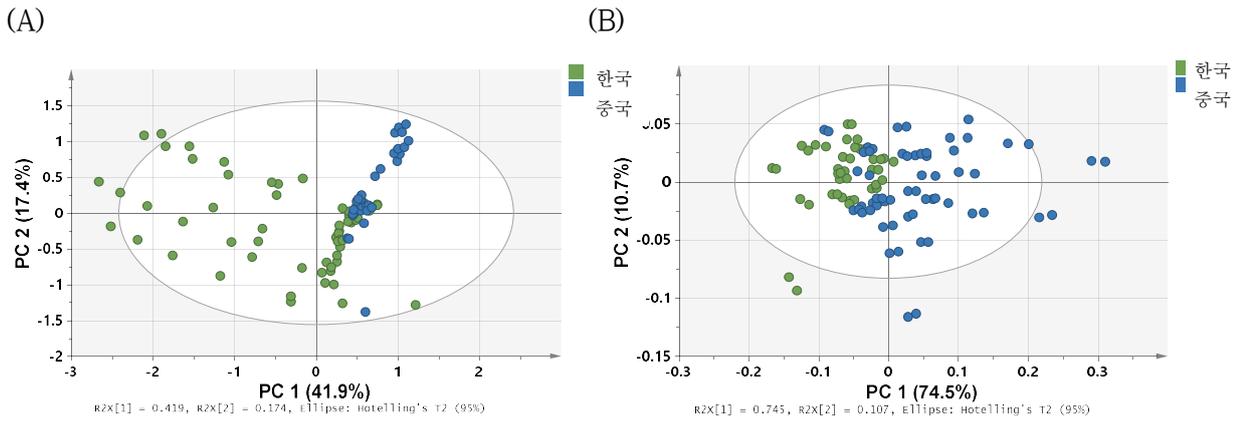


그림 111. 쌀 sample의 PCA score plot, 백미 (A), 현미 (B)

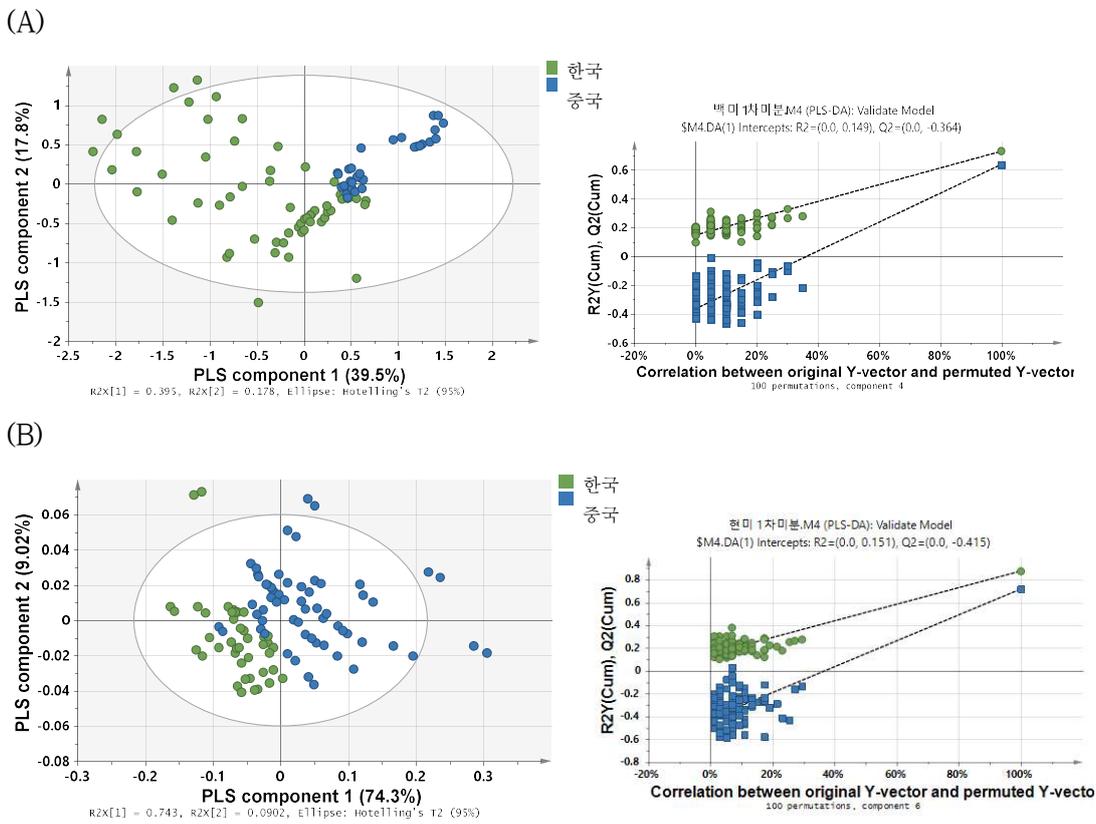


그림 112. 쌀 sample의 PLS-DA score plot 및 permutation test plot, 백미 (A), 현미 (B)

라. 협동연구기관 : 숭실대학교 의생명시스템학부 서정아 교수

(1) 원산지 판별 대상 작물의 미생물 군집 (community) 관련 현황 조사

(가) 원산지 판별 대상 농산물 선정 및 정보 조사

- 2016년 9월 2일 연구팀 미팅에서 농산물품질관리원에서 자체적으로 실시한 수요 조사와 원산지 위변조 사례 및 국내 생산/유통/수입되는 각 농산물 총량 (농림축산식품부 통계자료, 식품검역 통계자료, 관세청 통계자료 참조) 등을 근거로 대두, 참깨, 쌀을 선정하였다.
- 원산지 식별 정보는 국립농산물품질관리원 (<http://www.naqs.go.kr>)에서 조사하였고, 농촌진흥청에서 제공하는 작목기술정보 및 농사정보, 병해충발생정보를 제공하는 농사로 (<http://www.nongsaro.go.kr>)에서 대상 농작물의 주요 식물 병원균 및 환경 자료 등을 수집하였다.

① 대두 (콩) : 현재 우리나라의 대두의 자급율은 10.1%로 대부분 수입에 의존하고 있다. 2015년 농림축산식품부에서 발표한 농림수산물 수출입동향 및 통계자료에 따르면 농림수산물 중 대두의 수입량은 140만톤으로 10위 내에 위치하였다. 또한 두류 중 대두의 수입량이 대부분을 차지하였고, 주요 수입국은 브라질 (74.5만톤), 미국 (53.1만톤), 중국 (2.7만톤) 등이었다.

표 60. 대두 원산지 식별 정보

우리 농산물		수입 농산물
	[미국]	
	[중국]	
낱알의 크기가 고르지 않고 윤기가 있음. 덜 여문 낱알이 섞여 있음. 가로로 잘린 낱알이 섞여 있지 않음.		낱알의 크기가 고르고 윤기가 적음. 덜 여문 낱알이 거의 없음. 가로로 잘린 낱알이 간혹 섞여 있음.

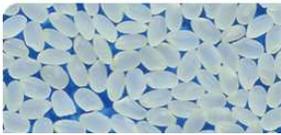
② 참깨 : 참깨는 국내 생산량 3.1만톤 (자급율 23.1%)에 약 7.8만톤을 수입하는 농산물로, 국내에 유통·소비·수입되는 양이 많아 우리나라 농산물 중 원산지 위변조 사례가 많은 것 중 하나이다. 주요 수입국은 인도 (3.2만톤), 중국 (2.2만톤), 에티오피아 (1.3만톤)이다. 참깨는 국내산과 수입산이 혼합된 참깨, 차좁쌀을 국산으로 표시하는 등 원산지 거짓표시가 지능화되고 있으나 혼합품은 육안식별이 어려워 원산지 단속에 한계가 있어, 과학적으로 뒷받침할 수 있는 분석법 필요하다.

표 61. 참깨 원산지 식별 정보

우리 농산물	수입 농산물	
	[중국]	[인도]
		
전체적으로 회백색 검은색과 갈색 낱알이 혼재 크기 균일하지 않음 / 표피 거침 씨눈의 모양이 뾰족 이물과 이종종자가 많이 섞여 있음	전체적으로 백색 다른 색상 낱알이 거의 없음 크기 거의 균일 / 표피 거침 씨눈의 모양이 뿔뿔 이물과 이종종자가 거의 없음	전체적으로 연한 황갈색 흑갈색과 연한 갈색 낱알이 혼재 크기 균일하지 않음 / 표피 매끈 씨눈의 모양이 뿔뿔 이물과 이종종자가 조금 섞여있음

③ 쌀 : 통계청에서 실시한 2015년 양곡소비량조사 결과에 따르면 1인당 연간 쌀 소비량은 62.9kg으로 소비량이 많은 농산물 중 하나이며, 자급율 95.7%의 농산물로 우리나라 주식으로 의미가 있다. 농림수산물 중 쌀의 수입량은 40.4만톤으로 약 10위이며 주요수입국은 중국 (18.4만톤), 미국 (15.3만톤), 베트남 (1.9만톤) 등 있다.

표 62. 쌀 원산지 식별 정보

우리 농산물	수입 농산물		
	[미국]	[중국]	[태국]
			
단립종 낱알 길이 짧고 넓음 맑은 백색 금간 낱알과 부서진 낱알 많음	중립종 국산과 중국산보다 길고 폭 넓음	단립종 낱알 길이 짧고 넓음 맑은 백색 금간 낱알과 부서진 낱알 적음 국산에 비해	장립종 국산과 미국산에 비해 가늘고 김

(나) 농산물 종류 별 (대두, 쌀, 참깨) 세균, 진균 병원균 및 내생균 (endophyte) 조사

① 대두 (콩)

㉔ 잎에 나타나는 병

1) 콩모자이크병

콩모자이크바이러스에 의해 발생한 병으로, 오갈병 또는 위축병이라고도 불렀다. 병의 증상은 보통 잎이 오그라들거나 쪼글쪼글하며 잎의 색깔이 부분적으로 연한 초록색으로 얼룩덜룩하게 모자이크 증상을 나타낸다. 또 품종에 따라서는 잎맥을 따라 까맣게 타들어 가며 새순이 갈색으로 변하며 죽는 증상을 보이기도 한다(이러한 경우를 괴저병이라고 한다).

㉕ 콩모자이크 (SMV: Soybean mosaic virus)

㉖ 콩황화모틀모자이크 (SYMMV: Soybean yellow mottle mosaic virus)

㉗ 콩황화일반모자이크 (SYCMV: Soybean yellow common mosaic virus)



모자이크 증상



괴저증상



종피의 변색

그림 113. 콩모자이크병 증상

2) 불마름병 (Bacterial pustule : *Xanthomonas campestris*)

잎에 옅은 녹색의 조그만 점무늬가 나타나며 진전되면 병무늬 (병반)가 커지면서 담갈색으로 변하고 주위가 노랗게 되며, 병반의 중앙에 조그만 돌기가 형성된다. 종자거나 병든 식물체의 잔재, 근권토양에서 월동하여 빗물에 의해 전염된다. 숨구멍 (기공) 같은 자연 개구부나 상처를 통하여 병원균이 침입하여 세포 틈새에서 증식하여 발병한다.

3) 들불병 (Wild fire : *Pseudomonas syringae* pv. *tavaci*)

잎에 다양한 크기와 형태의 갈색의 괴사 반점 주위에 넓은 황색의 띠를 형성한다. 습한 기후에 병반이 융합하여 확대되고 찢어지게 된다. 자연감염 시 불마름병과 동시에 발병하여 큰 피해를 준다. 병든 식물체의 잔재나 씨앗에서 겨울을 나며 (월동) 많은 작물의 뿌리 표면에서 성장한 다음 빗물이나 바람에 의해 전염된다.

4) 세균성 점무늬병 (Bacterial leaf blight : *Pseudomonas savastanoi*)

작고 모가진 열은 갈색의 증상이 잎에 형성되는데 점차 커지면서 붉은 갈색 내지 검은색으로 변하고 가운데 부분이 찢어진다. 어린 식물체는 피해증상이 더 심한 데 떡잎 끝 부분부터 증상이 나타나며 심하면 뒤틀리거나 오그라들어 죽는다. 꼬투리에도 증상이 나타나며 씨앗전염이 되기도 한다. 다소 서늘하며 습도가 높은조건, 즉 생육초기나 후기에서 잘 나타나며 빗물에 의해 전염된다.

5) 갈색무늬병(점무늬병) (leaf spot : *Cercospora canescens*)

콩을 계속해서 재배하는 밭에서 주로 나타나는 곰팡이 병으로서 잎맥을 중심으로 모양이 일정치 않은 갈색의 병 증상이 나타나며 나중에는 잎 전체가 누렇게 말라 낙엽이 진다. 아래의 잎으로부터 점차 위로 번지며 줄기나 꼬투리에도 증상이 나타난다. 고온 다습한 환경에서 비바람에 의해 전염된다.

6) 노균병 (Downy mildew : *Peronospora manshurica*)

병에 걸린 잎의 표면에 열은 녹색이나 노란색의 증상이 나타나며 시간이 지날수록 짙은 갈색으로 변한다. 잎의 뒷면을 보면 회색 또는 자주색의 털 같은 곰팡이를 볼 수 있어 다른 병과 쉽게 구별할 수 있다. 습도가 높고 온도가 섭씨 20℃와 25℃ 사이인 조건에서 병이 발생하기 쉽다. 그러나 10℃ 이하나 30℃ 이상에서는 병이 거의 생기지 않는다.

㉔ 줄기나 뿌리에 주로 나타나는 병

1) 검은뿌리썩음병 (Black root rot, Red crown rot : *Calonectria ilicicola*)

떡뿌리썩음병이라고도 불렸으며 1980년대 이후에 점차 늘어나고 있는 추세이다. 장마가 계속되고 서늘해지면 이 병이 많이 발생한다. 맨 먼저 땅 표면의 줄기부분에 병원균이 침입하는데 꼬투리가 달리기 시작하는 시기부터 병의 증상이 서서히 나타난다. 줄기 끝이 누렇게 변하며 잎이 열은 갈색으로 변하다가 시들거나 낙엽이 진다. 나중에는 뿌리 전체가 썩게 되어 꼬투리가 정상적으로 자라지 못한다. 농약으로는 방제가 잘 안되므로 병에 강한 품종을 심어야 하며 밭이 습하지 않도록 잘 관리해야 한다.

2) 콩역병 (Phytophthora root rot : *Phytophthora sojae*)

두류에만 발생하며 북미지역의 콩 재배에서는 피해가 가장 큰 병해이다. 국내에는 최근에 병발생이 확인되었으며 전국적인 발생상황은 조사된 바 없다. 병원균은 물을 매우 좋아하는 반수생균으로 배수가 불량하거나 침수된 포자에서 발생이 많다. 병원균은 자용동주균으로 병든 조직 내에 다량의 난포자를 형성한다. 국내 재배 품종별 저항성 차이는 큰 것으로 조사되었다. 병든 포기의 뿌리와 땅가 줄기는 썩고 시들다가 결국 말라죽는다. 지상부에 나타난 병 증상은 시들음병과 비슷하게 보이기도 하여 황화 위축 증상이 나타날 수도 있다. 전 생육기에 감염되며 어릴 때는 병이 더 빨리 진전되어 쉽게 죽는다.

3) 잎줄기마름병(Fusarium wilt, Fusarium blight, Root rot: *Fusarium oxysporum*)

토양 중에는 주로 후막포자로 생존하며 기주식물 없이도 다년간 생존한다. 병원균은 주로 상처

를 통해 침입하므로 토양해충과 선충의 밀도와 병발생이 밀접한 관계가 있다. 생육 중기 이후 28℃ 이상인 고온기에 병 증상이 잘 나타난다. 줄기의 도관부는 흑갈색으로 썩고 쪼개지면서 시든다. 병든 포기의 누렇게 되고 생육이 위축되며 잎은 활력을 잃고 결국 떨어진다. 병든 포기에는 열매가 제대로 열리지 않는다. 어릴 때는 주로 뿌리썩음 증상으로 나타나며 14℃ 정도인 저온기에 발생이 많다.



검은뿌리썩음병

콩 역병

잎줄기마름병

그림 114. 대두의 줄기나 뿌리에 발생하는 병증

4) 탄저병 (Anthracnose : *Colletotrichum truncatum*)

콩의 전 생육기간동안 식물체 모든 부분에서 병이 발생할 수 있는데 주로 생육후기에 그늘진 아랫부분의 줄기, 꼬투리 및 잎자루 등에서 나타난다. 콩이 어린 시기에도 병에 걸리며 이때는 줄기부분이 썩거나 떡잎과 초생엽들이 마르며 나중에는 떨어진다. 병에 걸린 부위는 모양이 일정치 않은 갈색의 병징을 보이며 검은색 또는 갈색의 털이 나 있다. 정상적인 꼬투리를 생산하지 못하며 심하게 병에 걸린 종자는 짙은 갈색을 나타내며 쭈그러진 모양이 된다. 12시간 이상 식물체가 젖어 있으면 감염되기 쉽고 모든 시기에 발병할 수 있다.

5) 균핵병 (Sclerotinia rot : *Sclerotinia sclerotiorum*)

병든 식물체의 조직 및 토양 내에서 균핵의 형태로 월동 후 발아하여 자낭반과 자낭포자를 형성한다. 자낭포자는 식물체의 약한 부위에 부착하여 침입하며, 균핵 및 균사체로부터 발아하여 뻗어 나온 균사가 식물체를 직접 침해하기도 한다. 습도가 높고, 기온이 15~25℃의 서늘한 상태에서 병발생이 심하다.

㉔ 종자에 나타나는 병

1) 자주빛무늬병 (Purple blotch, Purple seed stain, Purple spot : *Cercospora kikuchi*)

콩 씨앗에 자주색의 무늬가 생기게 하는 병으로서 껍질을 갈라지게도 만들어 콩의 상품성과 발아율을 떨어뜨린다. 잎, 줄기, 꼬투리에도 감염되나 심할 경우에만 약간 보라색의 병증세(병징)를 보이며 보통은 그 증상이 잘 나타나지 않는다.

2) 미이라병 (Pod and stem blight : *Diaporthe phaseolorum*)

줄기와 꼬투리, 때로는 잎자루 등에서 병의 증상이 나타나는데 꼬투리를 통하여 침입하여 콩 씨앗에 가장 심각한 피해를 준다. 이 병에 심하게 걸리면 종자가 쭈글쭈글하거나 모양이 일정치 않으며 껍질부분이 하얗게 밀가루를 발라 놓은 것과 같은 모양을 하여 상품가치를 떨어뜨

리며 발아가 되지 않는다. 꽃이 핀 후 종자가 자랄 때 습기가 많고 따뜻하면 이 병의 생길 확률이 높아지며 특히 제때 수확과 콩알떨기 (탈곡)를 하지 않고 밭에서 말리다가 비를 맞히게 되면 이 병에 걸리기 쉽다.



자주무늬병

미이라병

탄저병

그림 115. 대두의 종자에 발생하는 병증

㉔ 내생균

1) Leite *et al.* (2013)

- 대상 : Brazil의 Federal University of Viçosa에 위치한 Agronomy Experimental Field의 Conquista와 Monsoy 2가지
- 분석 범위 : ITS1F, ITS4 primer를 이용하여 rDNA의 ITS 부분 증폭 Automatic 96-capillary sequencer MegaBACTEM 1000 Algorithm for nucleotide analysis of diversity indexes 이용
- 결과 : (표 63)
 Cultivar Monsoy - *Colletotrichum* (46.3%), *Cochliobolus* (9.5%), *Fusarium* (6.3%)
 Cultivar Conquista - *Colletotrichum* (42%), *Xylaria* (8.2%), *Cochliobolus* (7.5%)

표 63. 두가지 대두 품종으로부터 얻은 곰팡이 균주

Species or Genera	Monsoy		Conquista		Monsoy Total	Conquista Total
	Fragment	Extinction	Fragment	Extinction		
<i>Alternaria alternata</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Alternaria arborescens</i>	0	1	1	0	1	1
<i>Alternaria dauci</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Alternaria macrospora</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Alternaria solani</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Alternaria sp.</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Ampelomyces sp.</i>	1	0	2	0	1	2
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	3	0	0	0	3	0
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Cercospora zebrinae</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Chaetomium sp.</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0	4	0	1	4
<i>Cladosporium colocasiae</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cochliobolus bicolor</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cochliobolus sp.</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cochliobolus lunatus</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Cochliobolus sativus</i>	9	0	4	2	9	6
<i>Colletotrichum boninense</i>	5	7	2	2	12	4
<i>Colletotrichum capsici</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Colletotrichum fragariae</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides 1</i>	8	0	5	0	8	5
<i>Colletotrichum gloeosporioides 2</i>	13	2	24	17	15	41
<i>Colletotrichum gloeosporioides 3</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Colletotrichum lupini</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Colletotrichum truncatum</i>	6	0	9	0	6	9
<i>Curvularia oryzae</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Davidiella tassiana</i>	2	0	3	0	2	3
<i>Diaporthe helianthi</i>	2	0	3	0	2	3
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	4	0	1	0	4	1
<i>Didymella bryoniae</i>	3	0	0	1	3	1
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Eutypella scoparia</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Fungal endophyte</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Fusarium equiseti</i>	2	3	3	0	5	3
<i>Fusarium proliferatum</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Gibberella moniliformes</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Guignardia mangiferae</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Guignardia vaccinii</i>	3	0	0	0	3	0
<i>Leptospora rubella</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Magnaporthe grisea</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Myrothecium gramineum</i>	0	0	2	0	0	2
<i>Myrothecium inundatum</i>	0	0	2	0	0	2
<i>Myrothecium sp.</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Nectria mauritica</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Neofusicoccum sp.</i>	2	0	0	0	2	0
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	2	0	0	2	0
<i>Ophiognomonium sp.</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Phaeosphaeriopsis sp. 1</i>	0	1	1	1	1	2
<i>Phaeosphaeriopsis sp. 2</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Phoma glomerata</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Phoma herbarum 1</i>	0	0	1	1	0	2
<i>Phoma herbarum 2</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Phoma sp.</i>	1	1	2	0	2	2
<i>Phomopsis sp.</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Rhodotorula sp.</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Sporobolomyces oryzaicola</i>	0	0	5	1	0	6
<i>Stemphylium solani</i>	0	0	2	0	0	2
<i>Xylaria berteri</i>	0	0	11	0	0	11
<i>Xylaria ianthinovelutina</i>	0	0	1	0	0	1

2) E. G. Fernandes *et al.* (2015)

- 대상 : Brazil의 Federal University of Viçosa에 위치한 Diogo Alves de Mello 실험 포장의 cultivar Monarca를 대상
- 분석 범위 : ITS1F, ITS4 primer를 이용하여 rDNA의 ITS 부분 증폭
GenBank database의 algorithm for nucleotide sequences (BlastN)
- 결과 (표 64) : *Agaricales* (2), *Botryosphaerales* (9), *Capnodiales*(24),
Diaporthales (21), *Dothideales* (1), *Hypocreales* (70),
Pleosporales (92), *Sordariales* (2), *Trichosphaerales* (1), *Xylariales* (3).

표 64. 대두의 잎과 뿌리로부터 분리한 내생곰팡이 리스트

Endophytic fungi isolated from the leaves and roots of *G. max*.

Isolated species	Leaves (%) [*]	Roots (%) [*]	Total (%) ^{**}	Order
<i>Alternaria arborescens</i>	4(2.13)	-	4(1.47)	Pleosporales
<i>Alternaria sp.</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Pleosporales
<i>Alternaria tenuissima</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Pleosporales
<i>Ampelomyces sp.</i>	17(9.09)	-	17(7.42)	Pleosporales
<i>Cercospora apii</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Capnodiales
<i>Cercospora beticola</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Capnodiales
<i>Cercospora guatemalensis</i>	2(1.06)	1(2.38)	3(1.31)	Capnodiales
<i>Cercospora piaropi</i>	4(2.13)	-	4(1.47)	Capnodiales
<i>Cercospora sp.</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Capnodiales
<i>Cercospora zebrina</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Capnodiales
<i>Chaetomium funicola</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Sordariales
<i>Chaetomium sp.</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Sordariales
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10(5.34)	-	10(4.36)	Capnodiales
<i>Cladosporium gossypicola</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Capnodiales
<i>Cladosporium sp.</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Capnodiales
<i>Cochliobolus geniculatus</i>	1(0.53)	1(2.38)	2(0.87)	Pleosporales
<i>Colletotrichum boninense</i>	6(3.20)	-	6(2.62)	Hypocreales
<i>Colletotrichum fruticola</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Hypocreales
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23(12.29)	-	23(10.04)	Hypocreales
<i>Colletotrichum karstii</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Hypocreales
<i>Comiothyrium sp.</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Pleosporales
<i>Coprinellus radians</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Agaricales
<i>Curvularia sp.</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Pleosporales
<i>Curvularia trifolii</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Pleosporales
<i>Diaporthe heveae</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Diaporthales
<i>Diaporthe helianthi</i>	13(6.95)	-	13(5.67)	Diaporthales
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	3(1.60)	-	3(1.31)	Diaporthales
<i>Fusarium oxysporum</i>	2(1.06)	21(50.00)	23(10.04)	Hypocreales
<i>Fusarium solani</i>	-	8(19.04)	8(3.49)	Hypocreales
<i>Fusarium sp.</i>	-	3(7.14)	3(1.31)	Hypocreales
<i>Gibberella zeae</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Hypocreales
<i>Guignardia mangiferae</i>	6(3.20)	-	6(2.62)	Botryosphaerales
<i>Leptosphaeria sp.</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Pleosporales
<i>Leptospora rubella</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Dothideales
<i>Macrophomina phaseolina</i>	-	1(2.38)	1(0.43)	Botryosphaerales
<i>Myrothecium inundatum</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Hypocreales
<i>Myrothecium sp.</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Hypocreales
<i>Neofusicoccum parvum</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Botryosphaerales
<i>Nigrospora oryzae</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Trichosphaerales
<i>Peyronellaea prosopidis</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Pleosporales
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Xylariales
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	1(0.53)	1(2.38)	2(0.87)	Xylariales
<i>Phoma glomerata</i>	5(2.67)	-	5(2.18)	Pleosporales
<i>Phoma pomorum</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Pleosporales
<i>Phoma sp.</i>	55(29.41)	1(2.38)	56(24.45)	Pleosporales
<i>Phomopsis sp.</i>	4(2.13)	-	4(1.47)	Diaporthales
<i>Saccharicola bicolor</i>	1(0.53)	-	1(0.43)	Pleosporales
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	2(1.06)	-	2(0.87)	Pleosporales
Total	187(81.65%)	42(18.34%)	229	

* Isolated fungi followed by the specified percentage of each environment (leaf or root).

** Sum total of isolated fungi in both environments followed by the total percentage in both environments.

② 참깨

1) 들림병 (Phytophthora blight : *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*)

이어짓기를 하여 병원균이 많아진 밭에서는 땅 가까이에 있는 줄기가 돌아가면서 흑갈색의 수침상으로 변색되고 잎이 시들음 증상을 보이며 줄기가 썩고 말라 죽는다. 병든 포기는 꼬투리가 갈색으로 변하면서 말라버리고 결실이 되지 않는다. 보통 온도가 높아지고 강우가 많아지는 7월 초순부터 발생이 시작되며, 7월 중순 이후부터 급격히 증가하여 수확기까지 계속 피해를 준다. 특히, 장마기에 침수되거나 물빠짐이 좋지 않을 때 많이 나타난다.

2) 흰가루병 (Powdery mildew : *Oidium sesami*)

잎, 줄기, 꼬투리에 발생하나 잎이 가장 피해가 크다. 처음에는 군데군데 흰가루 모양의 군사가 나타나고, 심해지면 잎전면에 흰가루 모양의 군사체로 뒤덮인다. 오래되면 잎이 조기낙엽되고, 후기생육이 불량하여 임실율이 떨어진다. 자낭각이나 군사체의 형태로 월동하여 1차전염이 될 수 있으나, 정확한 것은 알려진 바 없다. 병반상에 형성된 분생포자가 바람에 비산하여 다른 기주나 건전잎으로 전파된다. 흰가루병은 생육후기인 8월하순~9월초순에 많이 발생한다.

3) 시들음병 (Fusarium wilt : *Fusarium oxysporum* Sch. f. *sesami*)

참깨가 어릴 때에는 잘록병을 일으키고, 생육중기 이후에는 뿌리 윗부분의 줄기가 적갈색으로 변색되거나 흑색으로 변색되며 잎은 누렇게 변하며 시든다. 포장에서는 군데군데 발병된다. 생육기간동안 언제나 발생하며 모래땅에서 많이 발생한다.

4) 잎마름병 (Leaf blotch : *Corynespora cassicola* (Berkeley et Curtis) Wei)

7월중순 이후 아랫잎이 불규칙한 병무늬가 생기며, 심해지면 잎이 누렇게 되고 낙엽이되며, 윗잎에도 부정형의 병무늬가 생긴다. 병원균은 주로 종자 전염되며, 종자소독을 하지 않으면 일찍부터 발병되지만, 주로 생육중기 이후에 많이 발생한다.

5) 모잘록병 (Damping-off : *Rhizoctonia salani* kuhn)

참깨가 잘 발아하지 않거나, 어린 모의 땅가까이에 있는 줄기가 잘록하여 지면서 쓰러진다. 육묘기간, 이어짓기를 하여 병원균이 많아진 포장에서 많이 발생한다.

6) 꽃마름병 (Bacterial wilt : *Pseudomonas solanacearum* Smith)

처음에는 2~3일간 시들음증상을 나타내지만 아침, 저녁으로 회복되다가 갑자기 잎들이 아래로 축 처지면서 꽃 마른다. 줄기도 수침상으로 변색되는 경우도 있으며, 병무늬가 나타난 곳에는 우유빛의 세균성덩어리가 흘러나온다. 줄기를 잘라 눌러보면 세균덩어리가 나오는 것을 확실하게 알 수 있다. 7~8월경 배수가 불량하거나 이어짓기를 한 포장에서 발병이 심하다.

7) 세균점무늬병 (Bacterial leaf spot : *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*)

잎에 작은 흑갈색의 모무늬의 반점이 생기며 반점 주위가 노랗게 변한다. 여러개의 반점이 합쳐지면서 부정형으로 커지게 되며, 과습한 환경에서는 이 병반으로부터 우유빛 세균의 누출도 볼 수 있다. 잎 뒷면에는 병반 주위로 수침상이 나타난다. 주로 잎에 발생되지만 심하면 잎자루나 줄기에서도 병반이 형성된다. 병원세균은 병든 식물의 종자나 낙엽에서 월동하는 것으로

추정된다. 습도가 높은 환경에서 많이 발생되면 병든 식물조직에서 누출된 세균이 빗방울이나 바람에 의해 전파된다.

표 65. 참깨에 발생하는 병증과 발생시기 및 조건, 예방법

병명	발생시기 및 조건	경종적 예방
역병	장마 후 고온다습 조건	돌려짓기, 재식밀도
흰가루병	생육후기 장마 후	적정 재식밀도, 1주1분
시들음병	6월 하~7월 상, 모래땅 심함	돌려짓기, 재식밀도
잎마름병	장마 후 고온다습 조건	종자소독
갈록병	생육초기, 저온다습	종자소독
세균점무늬병	장마 후 고온다습 조건	종자소독



역병

흰가루병

시들음병

잎마름병

갈록병

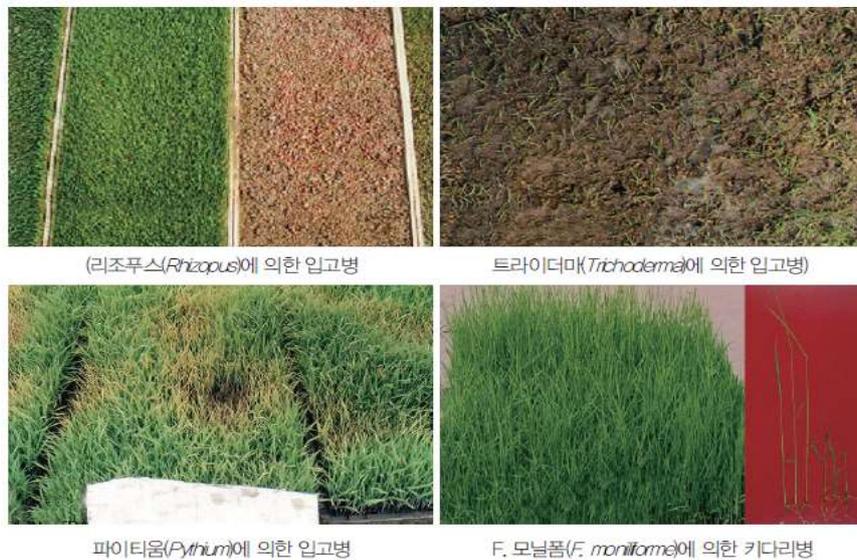
세균점무늬병

그림 116. 참깨에 발생하는 병증 사진

③ 쌀

㉓ 토양전염성 병해

- 1) *Fusarium* : 지제부와 엽초에 흰색, 담홍색의 균사체, 갈변, 위조
- 2) *B. Pythium* : 보온절충못자리에서 발생 심함, 초기는 종자발아불량 후기는 급격히 위조 고사, 군데군데 둥근 형의 고사환
- 3) *Rhizopus, Mucor* : 출아기의 고온 (30° C) 다습시 급격히 발생 지표면에 흰색의 균총이 뒤덮여 종자가 발아하지 못하여 고사함.
- 4) *Trichoderma* : 출아 시 30° C 전후의 고온, 산성토양 (pH 4.0)에서 발생하며, 파종상 내부가 저습할때 발생이 심함. 초기의 토양 내 백색의 균총 및 후기의 토양 내 청록색 균총 형성



(리조푸스(Rhizopus)에 의한 입고병)

트라이더마(Trichoderma)에 의한 입고병)

파이티움(Pythium)에 의한 입고병

F. 모닐폼(F. moniliforme)에 의한 카다리병

그림 117. 벼의 토양성 전염병 병해 사진

㉔ 종자 전염성 병해

1) 도열병 (Rice Blast : *Magnaporthe grisea*)

잎, 이삭, 이삭가지, 마디, 벼알 등의 지상부위에 병반을 형성하나 잎, 이삭, 이삭가지 도열병이 가장 흔하다. 잎에는 방추형의 병반이 형성되며 만성형일 경우 가장자리가 붉은색을 띠나 급성형일 경우 잿빛의 잔잔한 곰팡이 (분생포자)가 병반 표면을 덮는다. 이삭목이나 이삭가지는 열은 갈색으로 말라 죽으며 습기가 많으면 표면에 잿빛의 곰팡이가 핀다. 마디에는 암갈색의 병 무늬가 형성되며 잘 꺾이기 쉽고 다습할 때 표면에 잿빛의 곰팡이로 덮힌다. 잎도열병이 심하면 포기 전체가 붉은 빛을 띄우며 자라지 않게 되고 (좌지) 이삭 도열병이 걸린 이삭은 쪽정이 된다.

2) 깨씨무늬병 (Brown Spot, *Cochliobolus miyabeanus*)

잎에서 초기병반은 암갈색 타원형 피사부의 주위에 황색의 중독부를 가지고, 시간이 지나면 원형의 대형병반으로 윤문이 생긴다. 줄기에는 흑갈색의 미세한 무늬가 기본이고 후에 확대하여 합쳐지면 줄기 전체가 담갈색으로 변한다. 이삭줄기에는 흑갈색 줄무늬로 되어, 후에는 전체가 흑갈색으로 변한다. 도열병과 같이 이삭 끝부터 빠르게 침해되는 일은 없으며, 벼알에는 암갈색의 반점으로 되고 후에는 회백색 붕괴부를 형성한다. 또는 벼알 전면이 갈변하는 일도 많다. 도열병과 같이 백수가 되는 일은 없다.

3) 키다리병 (Bakanae disease : *Fusarium fujikuroi*)

키다리병은 육묘기에 키가 정상보다 1.5배 이상 웃자라는 증상을 보인 후 1~2주 이내에 위축되면서 말라 죽는 것이 일반적인 증상인데 이러한 키다리 증상은 동시에 발현하는 것이 아니라 파종 후 10일 경부터 발생하여 못자리 전 기간에 걸쳐 발생한다. 일반적으로 도장하는 증상만으로 키다리병을 판단하게 되면 이보다 실제 잠복해 있는 비율이 10배 이상 높기 때문에 주의 기울여야 한다.

㉔ 세균병

1) 벼흰잎마름병 (Bacterial Leaf Blight : *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)

발병은 보통 출수기 전후에 나타나나 상습발생지나 다 발생 발생지에는 본답 초기에 발병하며, 드물게는 묘판에서도 발병된다. 병징은 주로 엽신 및 엽초에 나타나며, 때에 따라서는 벼알에서도 나타난다. 병반은 수일이 경과 후 황색으로 변하고 선단부터 하얗게 건조되고 급속히 잎이 말라죽게 된다.

2) 세균성벼알마름병 (Bacterial Grain Rot : *Burkholderia glumae*)

주로 벼알에 발생하나 엽초에도 병징이 보인다. 벼알은 기부부터 황백색으로 변색되며 점점 확대되어 벼알 전체가 변색된다. 포장에서 일찍 감염된 이삭은 전체가 옅은 붉은색을 띠고, 고개를 숙이지 못하고 꼳꼳이 서 있으며, 벼알은 배의 발육이 정지되고 쪽정이가 된다. 늦게 감염된 벼알의 현미는 건전 미보다 작으며, 갈색의 줄무늬가 생긴다.

㉕ 바이러스병 : 줄무늬잎마름병 (Stripe : *Rice Strip Virus*)

초기 병징은 잎의 기부에 황록색의 작은 반점이 나타나며, 이후에 나오는 잎은 모두 병징이 나타나는데 묘판 말기 감염된 어린모는 이식 초기가 되면 신엽이 황색을 띠며 말려서 늘어져 죽는다. 후기에 감염될 경우 지엽에 황백색의 병반이 나타나며, 심한 경우는 위축되기도 하나 일반적으로 건전주와 같게 보인다. 전형적인 병징은 넓은 황색줄무늬 혹은 황화 증상이 나타나고, 잎이 정상적으로 전개되지 못하고 도장하면서 뒤틀리거나 아래로 처진다. 저항성 품종인 경우에는 고사하는 일이 거의 없으며, 크고 작은 황록색 병반이 불규칙하게 나타난다. 병징이 나타나는 시기는 묘판 말기 또는 6월경인데 7월 20일경부터 8월 초순에 가장 많이 나타난다.

㉔ 곰팡이병

1) 이삭누룩병 (False Smut, *Ustilaginoidea virens*)

벼알에서만 발생하며, 초기에는 벼알의 표면에 황록색을 나타내어 육안으로 쉽게 구분되고, 시간이 지나면 벼 껍질이 약간 열리고 황록색의 돌출물이 보이며 표면에 가루모양의 후막포자가 형성되면 검은색으로 변한다. 이삭누룩병에 걸린 벼알의 껍질을 벗겨보면 내부는 흰색이나 검은 색은 녹색 혹은 검은 색을 나타내는데, 이삭에 누룩을 형성하므로 쉽게 식별된다.

2) 잎집무늬마름병(Sheath Blight : *Rhizoctonia solani*),

처음에는 잎집에 병반이 나타나는데 물에 데친 것처럼 수침상의 타원형에서 암녹색으로 확대되면서 병반 주위가 연한 갈색으로 변한다. 병반의 크기는 일정하지 않고 7월 하순 ~ 8월 상순에 대부분 균핵을 형성하며 벼가 자라면서 병반이 점차 위로 올라가게 되는데 2차 전염은 잎집에 형성된 병반에서 나오는 균사에 의해 옆에 있는 줄기나 포기, 또는 잎에 새로운 병반을 형성한다.

3) 잘록병 (Damping off : *Rhizoctonia solani* Kuehn, *Pythium ultimum* Trow,

Thanatephorus cucumeris, *Pellicularia filamentosa*)

잘록병은 모판의 중요한 병해로, 많이 발생하면 모가 부족한 상태가 되어 피해가 크다. 이 병에 걸리면 배축의 지제부가 침해되어 모가 쓰러진다. 본잎이 2~3매 나왔을 때까지 발병하며 주간에는 약간 시들고 야간에는 회복되는 것도 있으나, 최후에는 지표면에서 부러진 것같이 넘어져 말라죽는다. 지제부가 암갈색으로 변하여 가늘게 잘록해지거나, 비가 와서 다습할 때는 약간 팽창하고 표면에 백색의 곰팡이를 형성한다.

㉕ 내생균 (Endophyte) :

1) Kim *et al.* (2011)

한국 : *Burkholderia*와 *Serratia* 등 - 병원성 진균류에 한 항진균활성 보유

일본 : *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mycobacterium* 등

중국 : *Stenotrophomonas*가 우점종, Archaea

인도 카르타나카 주 : *Streptomyces*가 우점종 - 항진균 활성 있음.

필리핀 : *Enterobacter*, *Bacillus*

2) L. Sun *et al.* (2008)

- 대상 : *Oryza sativa* L., variety 90-3, 중국의 Luannan (표 66)

- 분석 범위 : prokaryotic universal primer 중 799f와 1492r 이용

16S rDNA Clone Library 제작

ARDRA pattern에 의해 선별된 clone을 sequencing 분석

유전자 서열 분석은 ABI 377 automated DNA sequencer가 이용

GenBank/EMBL/DDBJ data base의 BLASTN을 이용하여 동정

표 66. 벼의 뿌리에 내생균으로부터 발견된 16S rDNA의 분포

Table 1. Distribution of 16S rDNA clones detected from endophytes in rice roots

Group	No. of OTUs	No. of clones	% Total clones	Closest NCBI match	% Identity		
Alphaproteobacteria	7	24	12.49				
		11	5.73	<i>Brevundimonas diminuta</i> LMG 2337 (AJ227779)	99		
		2	1.04	<i>Methylobacterium</i> sp.P1 (AF148859)	99		
		2	1.04	<i>Sinorhizobium teranga</i> LMG 7834 (X68388)	99		
		5	2.60	<i>Novosphingobium tardaugens</i> ARI-1 (AB070237)	97		
		1	0.52	<i>Caulobacter</i> sp. A1 (AF361188)	97		
		2	1.04	<i>Kaistina koreensis</i> (AB127972)	98		
		1	0.52	<i>Kaistina koreensis</i> (AB127972)	99		
		Betaproteobacteria	15	52	27.08		
				9	4.69	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (AF531768)	99
6	3.13			<i>Burkholderia</i> sp. 56 (AB114270)	99		
6	3.13			<i>Burkholderia fungorum</i> (AF215705)	99		
1	0.52			<i>Acidovorax facilis</i> CCUG 2113 (AF078765)	99		
2	1.04			<i>Comamonas testosteroni</i> SB2 (AY050494)	99		
2	1.04			<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(AB109889)	99		
1	0.52			<i>Deftia acidovorans</i> WDL34 (AF538930)	98		
1	0.52			<i>Deftia tsurukhatensis</i> HR4 (AY302438)	100		
3	1.56			<i>Herbaspirillum frisingense</i> Mb11 (AJ238359)	99		
1	0.52			<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> (AF078768)	99		
1	0.52			<i>Variovorax</i> sp. WDL1(AF538929)	99		
2	1.04			<i>Duganella violaceinigra</i> (AJ871470)	97		
2	1.04			<i>Methyloversatilis universalis</i> (DQ923115)	99		
13	6.77			<i>Gallionella ferruginea</i> (L07897)	94		
2	1.04			<i>Sterolibacterium deitrificans</i> (AJ306683)	94		
Gammaproteobacteria	9			48	25.00		
				16	8.33	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 15 (AY169434)	99
				12	6.25	<i>Enterobacter</i> sp. B509 (AB049108)	99
		10	5.21	<i>Pantoea</i> sp.(AJ002811)	99		
		4	2.08	<i>Stenotrophomonas</i> sp. B50 (AF128871)	99		
		1	0.52	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM30008 (X81667)	99		
		2	1.04	<i>Alkanindiges illinoisensis</i> (AF513979)	97		
		1	0.52	<i>Methylophaga marina</i> ATCC 35842 (X87338)	97		
		1	0.52	<i>Plesiomonas shigelloides</i> NCIMB9242 (X60418)	94		
		1	0.52	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Y18006)	100		
		Deltaproteobacteria	2	3	1.56		
				2	1.04	<i>Geobacter</i> sp. CdA-3 (Y19191)	98
				1	0.52	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> BRP4 (AF148939)	97
Epsilonproteobacteria	1	6	3.13				
		6	3.13	<i>Sulfonspirillum multivorans</i> K (X82931)	98		
CFB	3	8	4.17				
		5	2.60	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> IFO15942 (AB078060)	95		
		2	1.04	<i>Sphingobacterium</i> sp. p11E (AJ496037)	98		
Low G+C gram Positive bacteria	5	1	0.52	<i>Flavobacterium frigoris</i> LMG 21922 (AJ557887)	96		
		13	6.77				
		2	1.04	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 19gly4 (AF550610)	98		
		1	0.52	<i>Clostridium</i> sp XB 90 (AJ229234)	98		
		4	2.08	<i>Planomicrobium okeanokoites</i> 120804KB1 (AY730790)	100		
		3	1.56	<i>Planomicrobium mcmeekinii</i> S23F2 (AF041791)	98		
		3	1.56	<i>Acidaminobacter hydrogeniformans</i> glu63 (AF016691)	94		
		<i>Deinococcus-Thermus</i>	1	3	1.56		
				3	1.56	<i>Deinococcus indicus</i> Wt/1a (AJ549111)	96
Acidobacteria	1	1	0.52				
		1	0.52	<i>Holophaga foetida</i> DSM6591T (X77215)	95		
Uncultured bacterium	6	28	14.58				
		10	5.21	Uncultured bacterium (AM157348)	99		
		11	5.73	Uncultured bacterium 734 (AF513103)	96		
		1	0.52	Uncultured bacterium (AY945880)	97		
		3	1.56	Uncultured Bacteroidetes bacterium (DQ330488)	90		
		1	0.52	Uncultured bacterium (AB161300)	98		
		2	1.04	Bacterium Ellin514 (AY960777)	95		
		Archaea	2	6	3.13		
5	2.60			<i>Methanospirillum</i> sp. A2 (AJ133792)	97		
1	0.52			<i>Candidatus Methanoregula boonei</i> (DQ282124)	96		

3) S. H. Ji *et al.* (2014)

- 대상 : 다양한 벼 cultivar (*Oryza sativa* var. *Japonica* c.v. Chilbo, Chuchung, Haiami, Ilpum, Migwang, Nampyung, Sechuchung, Wongwang, Hwayung)의 잎, 줄기, 뿌리
- 분석 범위 : 16S rDNA
16S rDNA 유전자 서열 분석
NCBI BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- 결과 : *Penibacillus* 2종, *Microbacterium* 3종, *Bacillus* 3종, *Klebsiella* 4종.

(다) 대상 농산물 연관 미생물 군에 대한 유전체 정보 수집

- 대상 농산물 (대두, 쌀, 참깨) 연관 미생물 군에 대한 유전체 DB 정보 수집

미국 국립생물정보센터 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 대상 농산물과 연관있는 미생물군에 대한 유전체 DB정보를 수집하여 메타지노믹 시퀀스의 분석에 활용하였다. 아시아의 한국, 일본, 중국, 인도, 필리핀 지역의 벼의 내생세균으로서 우점종으로 알려진 균주에 유전자 정보를 NCBI에서 조사하였다 (표 67).

- 미생물 군집 데이터 프로세싱 정보 수집

① 메타지노믹스의 기법이 발전하게 된 계기는 2000년대 이후 차세대 염기 서열 분석 (Next generation sequencing) 기기의 눈부신 발전과 더불어 더욱 다양한 방면에 활용되기 시작하였으며 현재는 인간의 장내 미생물 (probiotics) 군집분석, 다양한 환경에서의 미생물과 환경과의 상호관계, 기주 동식물과 미생물의 관계 등에서 자연현상 규명을 위한 tool로 활용되고 있다 (그림 118).

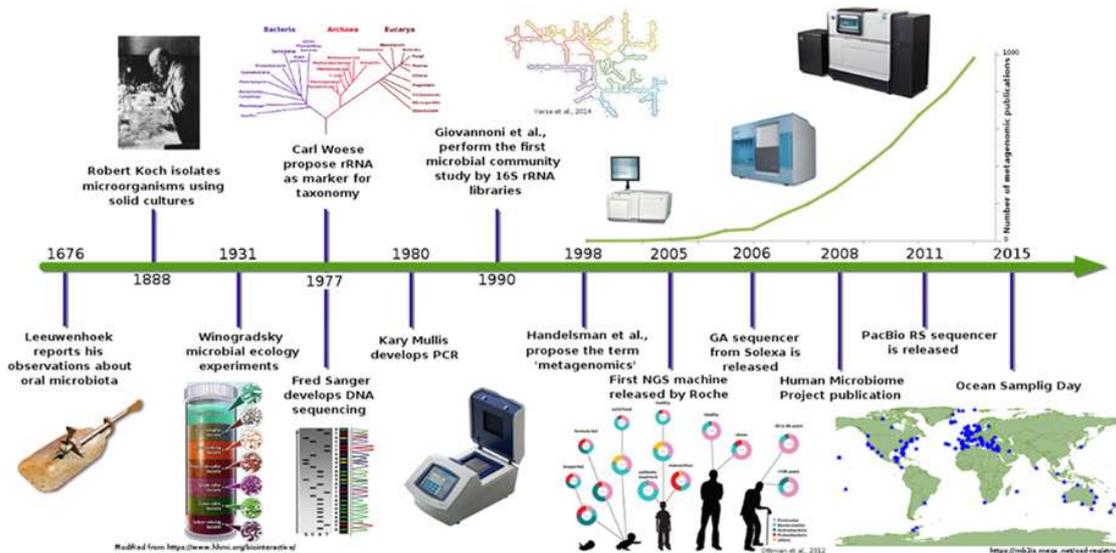


그림 118. 메타지노믹스의 기법 발전

표 67. 아시아 지역의 우점종인 베타 내생세균의 유전자 정보

Db	Description	한국		일본			중국	인도	필리핀
		<i>Burkholderia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Enterobacter</i>
Assembly	genome assembly information	0	381	1,320	32	5,315	152	842	1,044
BioProject	biological projects providing data to NCBI	0	198	1,970	43	3,664	150	833	392
BioSample	descriptions of biological source materials	0	561	4,174	41	36,767	289	1,939	2,341
Clone	genomic and cDNA clones	0	0	0	0	0	0	0	0
dbVar	genome structural variation studies	0	0	0	0	0	0	0	0
Genome	genome sequencing projects by organism	0	17	289	17	440	21	278	32
GSS	genome survey sequences	0	52	1,093	6	46	1	137	0
Nucleotide	DNA and RNA sequences	2	167,406	1,522,322	11,888	1,487,198	65,081	1,033,003	249,901
Probe	sequence-based probes and primers	0	10	1,661	9	1,122	31	366	13
SNP	short genetic variations	0	0	0	0	40,564	0	0	0
SRA	high-throughput DNA and RNA sequence read archive	1	445	2,684	17	35,060	173	606	2,302
Taxonomy	taxonomic classification and nomenclature catalog	0	1	2	1	1	1	1	1

(NCBI Genebank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

② 기본적인 메타지노믹스의 파이프라인은 아래와 같이 시료수집에서 DNA추출 후 세균, 진균의 미생물군의 16S rDNA, 5.8S rDNA-ITS region을 PCR (Polymerase Chain Reaction)로 증폭하여 수많은 미생물군집의 증폭된 DNA fragment의 sequence를 확보하고 1차 군집 분석을 통하여 어떤 미생물 군들이 시료에 존재하는지를 종 (species), 속 (genus), 과 (family), 강 (class), 문 (phylum) 등의 taxonomy 체계에 따라 분류하여 분석하였다.

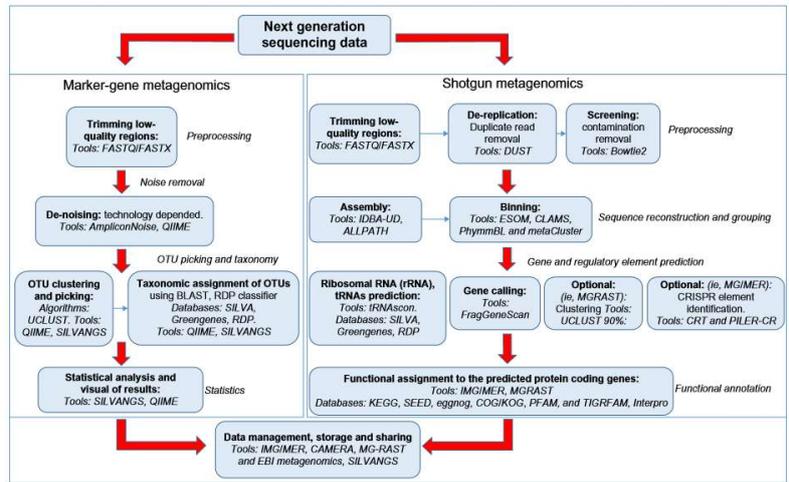
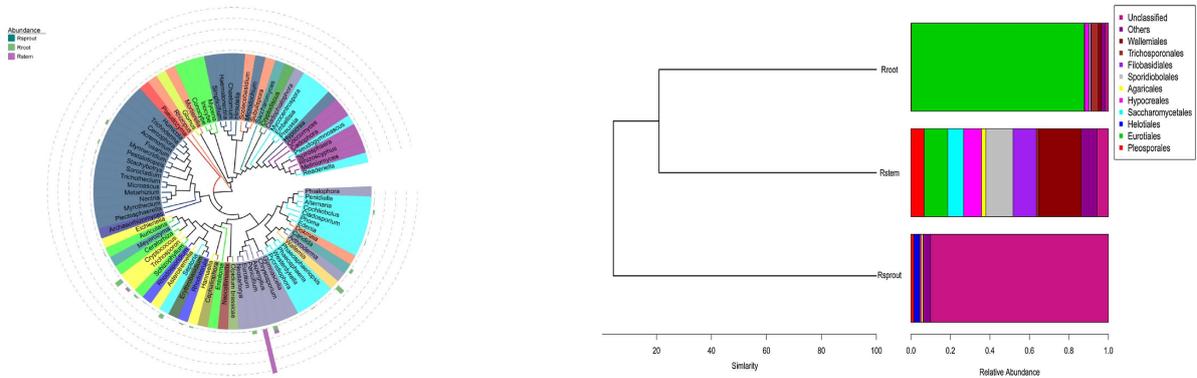


그림 119. 메타지노믹스 파이프라인 (Oulas A *et al.*, 2015)

③ 특정 시료로부터 분리한 미생물 genomic DNA의 메타지노믹 시퀀스 결과로 생성되는 1차 분석의 결과들은 NGS 시퀀싱 서비스 회사에서 시퀀스 raw data로 가공해 주는 데이터로 아래와 같은 형태들이 있는데 각 미생물 군집을 어떤 분류체계로 나타낼 것인가에 따라 다른 분류체계로 visualization시킬 수 있다.



Phylogenetic distributions of fungal taxa in samples of rice sprouts, stems, and roots (designated as Rspout, Rstem, and Rroots, respectively).

Phylogenetic dendrogram of fungal endophytic microbial communities in samples of rice sprouts, stems, and roots (designated as Rspout, Rstem, and Rroots, respectively).

그림 120. 내생진균의 계통분포도 (W. Wang *et al.* (2016))

④ 또한 시료에서 차지하는 각 미생물 군의 abundance의 상대적인 비교는 아래와 같은 도식으로 비교 분석이 가능하며 원산지가 다른 농산물 시료의 미생물 군집 분석 결과를 아래와 같이 분석할 경우 1차 분석에서 동일한 미생물 군은 제외하고 상이한 미생물 군집을 선별해 내는 방법으로 수행할 것이다.

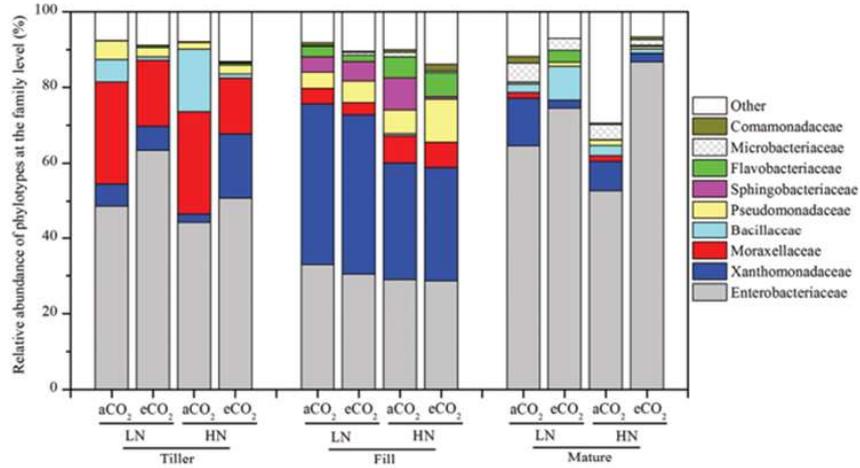


그림 121. 벼 잎의 내생세균의 abundance (Ren *et al.* (2015) *Front. Microbiol.*)

⑤ 미생물의 군집 구성을 기반으로 시료간의 Unifrac clustering을 하면 아래와 같은 도식으로도 분석이 가능하며 heatmap gradient에 따라 각 미생물 군집의 상대적인 양을 표시할 수 있다.

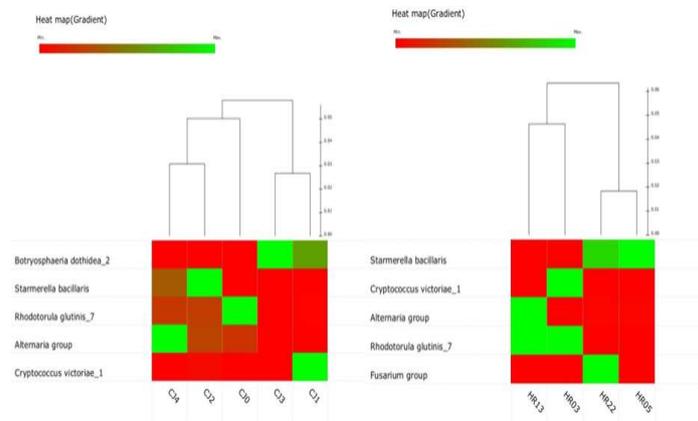


그림 122. 농산물 (사과)로부터 얻은 품종별 미생물 군집 clustering (출처 : 협동기관 농식품부 과제 (315043-3))

⑥ NGS 시퀀싱 서비스회사에서 의뢰한 gDNA로 시퀀싱 후 1차적인 미생물 군집 분석이 가능한데, 본 연구에서는 1차 분석결과를 활용하여 원산지가 서로 다른 농산물을 차별화 할 수 있는 미생물 군을 선별해 내는 전략이 필요하다.

(라) 메타지노믹스 활용 효율적인 바이오마커 발굴을 위한 프로그램 개발 정보 수집

: 원산지 별 농산물 시료의 차별화된 상이한 미생물 군 선별 및 바이오마커 탐색

- 메타지노믹스 시퀀스를 활용하여 바이오마커를 발굴하고자 하는 시도는 인간의 질병 진단을 위한 마커발굴을 위해 메타지노믹스 시퀀스로부터 차별화되는 미생물 군집을 필터링해 내는 프로그램 개발 내용이었고 바이오마커를 발굴해 내는 연구들은 주로 대상 질병의 환자의 시료를 분석하여 특이한 SNP를 발견하는 내용으로 활발히 진행 중이다.
- 그러나 원산지를 판별할 수 있는 미생물 군을 선별한 후 특정 미생물군 (종 또는 강 수준의 분류)에서 특이 유전자를 탐색하여 바이오마커로 활용 가능성을 모색하는 것은 현재까지 문헌 조사를 통하여 볼 수 없었던 전략이다.
- 메타지노믹스 분석을 통하여 공통적이고 특이적인 미생물 군집을 바코드화하여 아래와 같이 diversity를 분석하고 미생물 군집의 분류 단위를 종 (species)로 구별하여 원산지에 따라 차별화되는 분류군에 따라 바이오마커를 탐색하는 범위는 좁혀갈 예정이다.

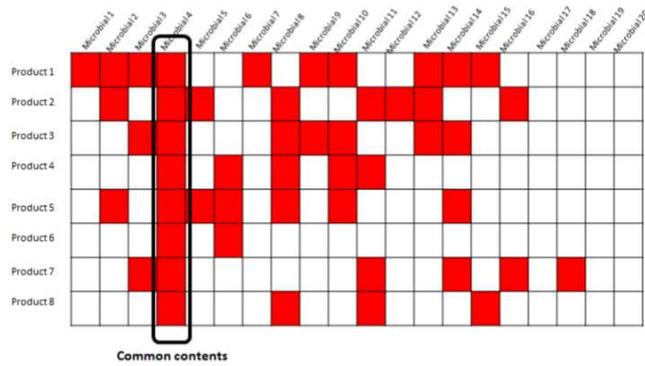


그림 123. 원산지 별 농산물 시료의 차별화된 상이한 미생물 군 선별 및 바이오마커 탐색

- 메타지노믹스 시퀀스의 분석은 homology search based의 analysis인데 현재 개발되어 활용되고 있는 프로그램이나 방법들이 정형화 되어 있지 않고 다양한 분야에서 다양한 목적으로 분석이 됨에 따라 본 연구에서 필요로 하는 방향으로 기존의 tool을 수정, 보완한 새로운 tool이나 프로그램을 개발할 가능성도 두고 있다 (표 68).
- 또한 메타지노믹스의 raw data는 시퀀스 read가 매우 많은 편이라 일반적인 서버에서 분석이 어려운 경우가 많으므로 필요 시 메타지노믹스 시퀀스 프로파일링을 위한 IT 인프라를 구축할 예정이다.

표 58. 주요기능에 따라 그룹화 한 메타지놈 시퀀스 분석에 쓰이는 Tool

Shotgun metagenomics	Assembly	EULER ⁴¹			RITA ¹⁸³	
		Velvet ⁴²			PILER-CR ⁹⁰	
		SOAP ⁴³			tRNAscan ¹⁸⁴	
		ABYSS ⁴⁴			KEGG ⁹⁹	
		MetaVelvet ⁴⁶			MetaCluster TA ⁷¹	
		MetaVelvet-SL ⁴⁵			SEED ¹⁰⁰	
		Meta-IDBA ⁴⁷			eggNOG ¹⁰¹	
		IDBA-UD ⁴⁸			ProViDE ¹⁸⁵	
		Newbler (Roche)			COG/KOG ¹⁸⁶	
		MIRA ³⁷			PFAM ^{103,104,187}	
		Mapsembler ¹⁷¹			TIGRFAM ¹⁰⁵	
		ALLPATHS ^{172,173}			MetaPhlan ¹⁸⁸	
		MetaORFA ^{174,175}			HighSSR ¹⁸⁹	
		MetAMOS ³⁸			Blat ¹⁰⁷	
		Binning	TETRA ⁵¹		Analysis pipelines	IMG/MER ^{84,190}
			S-GSOM ⁵²			MG-RAST ⁹⁵
			PhylopythiaS ^{54,55}			MEGAN 5 ⁸⁷⁻⁸⁹
TACO ⁵⁶			CAMERA ¹¹²			
PCAHIER ⁵⁷			Parallel-META ^{74,191}			
ESOM ⁵⁸			EBI Metagenomics ¹⁰⁸			
ClaMS ⁶⁰			METAREP ¹⁹²			
CARMA ⁶¹			PHACCS ¹⁹³			
WGSQuikr ¹⁷⁶						
SPHINX ¹⁷⁷			Marker gene metagenomics	Standalone software		QIIME ^{111,194}
MetaPhyler ⁶²						Mothur ¹²¹
Sort-ITEMS ⁶³						JAguc ¹⁹⁵
PhymmBL ⁷⁰						M-pick ¹⁹⁸
MetaCluster ^{71,172}		OTUbase ¹⁹⁷				
Annotation	FASTX-Toolkit ⁷⁴				CopyRighter ¹⁹⁸	
	FastQC ⁶⁷				AbundantOTU ¹⁹⁹	
	SolexaQA ⁷⁸				UniFrac ^{145,200}	
	Lucy 2 ⁷⁹				ESPRIT ^{141,201}	
	DUST ⁸²				Analysis pipelines	SILVA ¹²⁵
	Bowtie ⁸³					FunFrame ²⁰²
	MetaGeneMark ⁸⁴					PANGEA ²⁰³
	LEfSe ¹⁹					FastGroupI ²⁰⁴
	TACO ⁵⁶		CLOTU ²⁰⁵			
	Metagene ⁸⁵		Denosing	AmpliconNoise ¹²²		
	CREST ¹⁷⁸			DADA ²⁸		
	Prodigal ⁸⁶			JATAC ¹²⁷		
	mOTU-LG ¹⁷⁹			UCHIME ²⁰⁶		
	Orphelia ⁸⁷			Bellerophon ²⁰⁷		
	Kraken ¹⁸⁰		Databases	CANGS ^{208,209}		
	FragGeneScan ⁸⁸			SILVA ¹²⁵		
	CRT ⁸⁹			Greengenes ⁹⁴		
NBC ¹⁸¹		Ribosomal Database Project (RDP) ²¹⁰				
MyTaxa ¹⁸²		Unite ¹²⁶				

(Continued)

(2) 농산물 대두의 미생물 gDNA를 활용하여 메타지놈 시퀀스 생산 및 미생물 균집 분석

(가) 원산지 판별 대상 농산물 대두 시료 수집

① 국내 원산지 판별 대상 대두 시료 수집

국내산 원산지 판별을 위한 시료는 2015년에 경기, 강원, 충청, 경북, 경남, 전북, 전남 7개도에서 생산된 대두 총 17점을 국립농산물품질관리원으로부터 제공 받아 (표 69), 그중 국내 최대 생산지 (2016 통계청 농작물 생산량)인 전남 (15k-3)과 경북지역 (15k-10), 생산지의 기후가 다른 강원 (15k-6)과 충청도 (15k-1) 대두시료로부터 미생물 gDNA를 추출하였다.

표 69. 국내 원산지 판별 대상 대두 시료 정보

No.	지역	시료번호	생산순위	생산비 (%)	
1	전남	강진	15k-03	1	18.1
		강진	15k-04		
		나주	15k-16		
2	경북	대구달성	15k-10	2	18.0
		논산	15k-01		
3	충청	천안	15k-15	3	14.7
		보은	15k-08		
		양양	15k-05		
4	강원	인제	15k-06	4	9.9
		횡성	15k-17		
		안성	15k-07		
5	경기	파주	15k-11	5	8.5
		이천	15k-12		
		함양	15k-09		
6	경남	군산	15k-02	6	7.3
		완주	15k-13		
7	전북	완주	15k-13	7	6.1
		완주	15k-14		

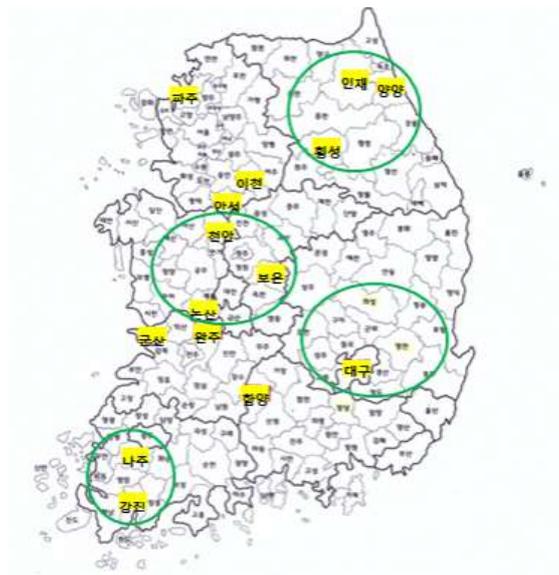


그림 124. 국내 원산지 판별 대상 대두 시료 수집 위치

② 중국 원산지 판별 대상 대두 시료 수집

중국 원산지 판별을 위한 시료는 2016년에 생산된 대두 총 13점을 주관 기관으로부터 제공받아, 생산지역의 기후에 따라 구분하고 (표 69) 그 중 대표적인 생산지인 흑룡강성 (15C-02), 산둥성 (15C-06), 광둥성 (15C-12) 3지역의 대두 시료로부터 미생물 gDNA를 추출하였다.

표 70. 중국 원산지 판별을 위한 시료

번호	지역		시료번호
1	내몽골	싱안맹	15C-01
2	흑룡강성	하얼빈	15C-02
3	길림성	메이허코우쓰	15C-03
4	요령성	단둥시	15C-04
5	하북성	스자좡	15C-05
6	산둥성	지닝시	15C-06
7	호북성	황스시	15C-07
8	안휘성	화이베이시	15C-08
9	절강성	핑후시	15C-09
10	복건성	룽옌시	15C-10
11	강서성	주장시	15C-11
12	광둥성	사오관시	15C-12
13	광서장족자치구	바마야오족 자치현	15C-13



- 동북지역 : 여름 (따뜻함), 겨울 (춥고 건조) : 2, 3, 4
- 북쪽지역 : 여름 (덥고 습함), 겨울 (춥고 건조) : 5, 6
- 남쪽지역 : 여름 (덥고 습함), 겨울(조금 춥고 건조) : 7, 8, 9, 11
- 동남지역 : 여름 (매우 덥고 습함), 겨울 (따뜻) : 12, 13
- 서북지역 : 여름 (매우 덥고 건조), 겨울 (춥고 건조) : 1

그림 125. 중국 원산지 판별을 위한 대두 시료 수집 위치

③ 미국 원산지 판별 대상 시료 수집

미국 원산지 판별을 위한 시료는 2016년에 생산된 총 7점을 주관기관으로부터 제공받아 (표 71), 그중 미국 대두 최대 생산지 일리노이 (15U-04)의 대두시료로부터 미생물 gDNA를 추출하였다.

표 71. 미국 원산지 판별을 위한 시료

번호	지역	시료번호
1	Quebec (#1) (몬트리올 남부)	15U-01
2	Ontario(#5)	15U-02
3	Minnesota (#2)	15U-03
4	Indiana (#3)	15U-04
5	Illinois (#4)	15U-05
6	Michigan (#6)	15U-06
7	Illinois and Indiana (#7)	15U-07



그림 126. 미국 원산지 판별을 위한 대두 시료 수집 위치

(나) 미생물 DNA 추출법 개선 및 비교 분석

① 연구 수행 방법

본 연구에서는 대상 농산물의 특성과 미생물의 특성, 즉 부생적으로 농산물 겉면의 환경으로부터 기인한 미생물 군집, 농산물 (작물) 세포 내부에 기생 또는 공생을 하는 미생물 군집을 분석하는 것이 목적으로 대상 농산물 자체의 gDNA가 최대한 혼입되지 않고 quality 높은 DNA 확보하는 것이 관건이다. 따라서 1차년도 연구 결과를 바탕으로 효율이 높은 phosphate-buffered saline (PBS) 여과 방법과 PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO, cat# 12855-50)를 이용하여 대두의 겉면에 환경으로부터 기인하여 군집을 이루고 있는 미생물의 DNA를 추출 하였다. 그림 127에 대두로부터 미생물 gDNA를 추출하는 과정을 도시하였다.



그림 127. 대두로부터 미생물 genomic DNA 추출 과정

농산물 자체의 gDNA가 최대한 혼입되지 않게 미생물 gDNA를 확보하기 위하여 대두 10g을 기준으로 3가지 전처리 방법을 시행하였다 (표 72).

표 72. 대두 시료로부터 미생물 gDNA를 추출하기 위한 전처리 방법 비교

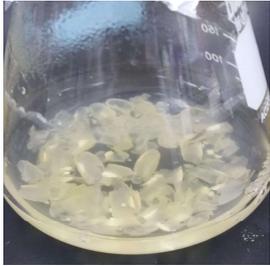
No.	전처리법 I	전처리법 II	전처리법 III
사진			
방법	분쇄기로 대두 분쇄 (4~5등분이 되도록)	분쇄기로 표면에 상처를 낸 후 껍질만 분리	수술용 메스로 상처를 낸 후 PBS에 침지하여 껍질 분리

그림 128와 같이 대두를 3가지 방법으로 전처리하여, 40mL PBS buffer에 3시간 침지한 후, 25° C, 180 rpm 1시간 진탕하였다. (II, III번 전처리법은 대두는 제거하고, 껍질만). 진탕한 PBS buffer를 공극 크기 15 μ m의 filterpaper (Whatman 520A 1/2)로 여과한 후 13,000rpm, 10분간 원심 분리한 Pellet을 PowerSoil gDNA extraction kit으로 미생물 gDNA 추출하였다. Nanodrop (ThermoFisher, USA)으로 미생물 gDNA의 농도를 측정 후 표 73의 primer set으로 세균과 진균 대상 유전자 유무를 확인하기 위하여 PCR 증폭을 확인하였다. 또한 대두 gDNA의 혼입을 확인하기 위하여 chloroplast 존재 유무를 확인할 수 있는 primer set으로 PCR로 유전자 증폭하고 전기영동으로 확인하였다 (그림 128).

표 73. 대두로부터 추출한 미생물 gDNA의 세균, 진균, chloroplast 유전자 증폭 primer set

Target	Name	Sequences	Ref.
Bacteria	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Britschgi <i>et al.</i> (1998)
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
Fungi	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	white <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Chloroplast	cp103F	GCATCCATGGCTGAATGG	Yang <i>et al.</i> (2015)
	cp103R	CAAAGAAGAGTTTCGACCCA	

② 연구 결과

대두시료를 4~5등분으로 분쇄하고 PBS에 침지 (전처리 I)하여 미생물 gDNA를 추출한 경우 농도는 12~20ng/ul로 메타지노믹싱이 가능하나 대두 gDNA가 다량 혼입됨을 chloroplast의 유전자 증폭으로 확인하였으며 이는 메타지노믹싱 수행 시 미생물군집 분석에 방해요인이 될 것으로 예측되었다. 전처리 I 방법을 보완하기 위하여 분쇄기로 대두의 표면에 상처를 낸 다음 껍질만 분리하여 PBS에 침지하여 미생물 gDNA를 추출한 (전처리 II) 경우 농도는 5.9~6.6 ng/ul로 방법 I과 비교하여 1/2로 감소하였으나 chloroplast 유전자의 증폭 정도가 현저하게 줄었다. 그러나 미세한 대두 시료 조각이 포함되어 시료의 경도에 따라 chloroplast 유전자 증폭 정도가 높게 나타나는 시료가 있어, 대두 시료의 혼합비율을 낮추기 위하여 수술용 메스로 대두 표면에 칼집을 낸 후 PBS buffer에 3시간동안 침지하고 대두는 제거하고 껍질만 분리하여 미생물 gDNA를 추출하였다 (전처리 III). 표 74에 전처리 III방법으로 추출한 시료의 미생물 gDNA 농도를 정리하였다.

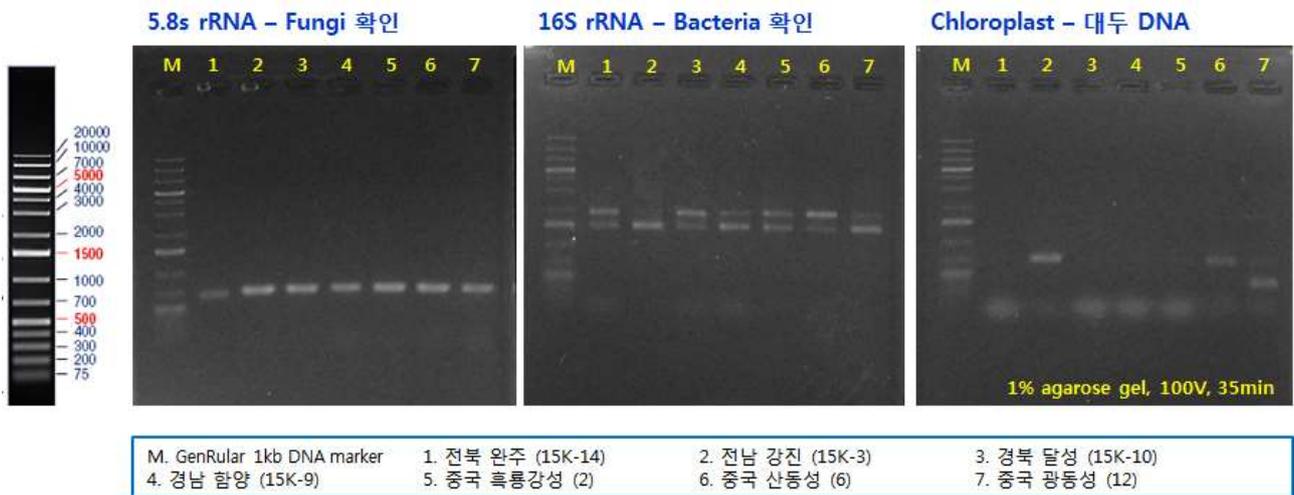


그림 128. 전처리 III번으로 추출한 대두시료의 미생물 gDNA로부터 미생물 군집 분석을 위한 유전자 증폭 확인

표 74. 원산지 판별을 위한 대두 시료의 미생물 gDNA 농도

No.	Sample Name	260/280	DNA Concentration (ng/μl)	Total Amount (ng)
1	전남 강진 (15K- 3)	1.91	5.8	232
2	경북 달성 (15K-10)	1.91	5.9	236
3	충청 논산 (15K-01)	1.91	4.9	196
4	강원 인제(15K-06)	2.00	2.7	108
5	경남 함양 (15K- 9)	1.69	6.6	264
6	전북 완주 (15K-14)	1.59	3.6	144
7	중국 흑룡강성 (2)	2.98	4.6	184
8	중국 산둥성(6)	1.94	5.0	200
9	중국 광둥성(12)	1.90	4.7	188
10	미국 일리노이 (4)	2.00	5.0	200

국내산 시료의 미생물 gDNA 농도는 2.68~6.6ng/ul, 중국산 시료 4.6~5ng/ul, 미국산 시료 4.95ng/ul 으로, 세균과 진균 대상 유전자 증폭을 확인하였으며 chloroplast는 존재하지 않는 것을 확인하였다 (그림 115). 미생물 gDNA를 추출한 10개의 시료 중 국내산과 중국산 시료의 미생물 군집 분석을 위하여 경북달성 (15K-10)과 중국 흑룡강성 (15C-02)의 시료를 (주)마크로젠에 시료를 의뢰하였으며 NGS Library QC 결과 Metagenome Amplicon 121ng/ul으로 통과하였다.

(다) 농산물 대두로부터 선택배지 활용한 상이한 미생물 (진균류)군의 선택적 분리 및 동정

① 연구 수행 방법

미생물 gDNA를 추출하기 위하여 전처리 한 대두시료를 PBS buffer에 침지하여 진탕 후 원심 분리를 하기 전에 1mL centrifugal tube에 시료를 샘플링하여 진균 선택 배지인 Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC배지 ; Peptone 0.5%, Glucose 1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄7H₂O 0.05%, 0.2% Dichloran 1.0 ml, Rose bengal 0.0025%, Chloramphenicol 0.01%, Agar 1.5%)고체평판 배지에 100 μL씩 도말하여 25℃에서 5일간 관찰하였다. 또한 Potato Dextrose agar (PDA : Potato starch 0.4%, Dextrose 2%, Agar 2%) 고형배지에 각 시료의 원액을 도말하여 25℃와 37℃에서 5일간 관찰하였다.

② 연구 결과

본 연구에 원산지 판별을 위한 대두 시료는 식량자원으로 시장에서 먹거리로 판매되는 상품이므로, 대두의 겉표면이나 내생하고 있는 미생물의 농도가 낮을 것으로 예상하였으나, NGS 기법으로 생산하여 분석한 미생물군집에서 얻은 결과와 비교하여 유용한 미생물을 분리·동정하고 그 결과로부터 유용한 유전자를 선별하기 위하여 시도하였다. Dichloran rose bengal chloramphenicol agar 배지에서 colony가 관찰되지 않았다. Dichloran과 Chloramphenicol의 영향으로 colony가 발견되지 않는 것으로 생각되어 Potato Dextrose agar (PDA : Potato starch 0.4%, Dextrose 2%, Agar 2%) 고형배지에 도말하였으나 또한 colony가 관찰되지 않았다. 예상했던 결과와 같이 대두 시료로부터 추출한 미생물 gDNA 농도가 2~6ng/uL로 낮은 것을 확인하였고, 이는 선택배지에 미생물의 배양하기에 낮은 농도로 판단되어 균주 분리 및 동정은 불가능하였다.

(라) 메타지놈 시퀀스 데이터 생산, 분석 및 가공

① NGS 기법에 의한 유전체 정보 생산

㉓ 연구수행방법

대두에서 추출한 gDNA는 (주)마크로젠에 메타지노믹스 서비스를 의뢰하여 시퀀싱하고 분석을 수행하였다. 메타지놈 시퀀스 데이터 생산 Workflow는 그림 130과 같다.



그림 129. 메타지놈 시퀀스 데이터 생산 Workflow

NGS library 제작을 위한 PCR은 진균의 internal transcribed spacer 2 (ITS2) 지역을 증폭시켰고, 세균은 16S rRNA 유전자의 V3~V4 부분을 증폭시켰다 (표 75, 그림 130). 이를 Illumina사의 MiSeq 플랫폼을 이용하여 차세대염기서열분석법 (NGS)으로 시퀀싱하고 분석을 수행하였다.

표 75. NGS library 제작을 위한 PCR primer 목록

Target	Primer name	Primer sequences
Fungi	ITS3	5' -GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
	ITS4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Bacteria	519F	5' -CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
	806R	5' -GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

<출처 : 마크로젠 제공>

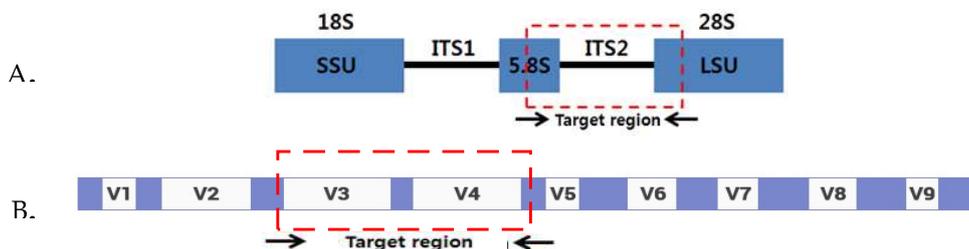


그림 130. 메타지놈 시퀀싱에 이용되는 유전자 지역 : (A)진균 ITS, (B) 세균 16S rRNA

㉔ 연구결과

한국산 대두와 중국산 대두의 원산지별 미생물 군집을 분석하기 위하여 NGS 기법에 의해 16S rRNA 메타지놈 시퀀스는 한국산 대두 (15K-10)에서 92,795,892 bp가 생산되어 총 308,292 reads를 얻었고, 중국산 대두 (15C-02)는 87,368,862bp가 생산되어 총 290,262 reads를 얻었다 (표 76).

표 76. 세균 16S rRNA 메타지놈 시퀀스 생산 정보

Sample ID	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
한국산 대두 (15K-10)	308,292	55.465	44.53	83.672	74.123
중국산 대두 (15C-02)	290,262	55.815	44.19	80.864	70.942

또한 ITS 메타지놈 시퀀스는 한국산 대두 (15K-10)에서 81,608,324 bp가 생산되어 총 271,124 reads를 얻었고 중국산 대두 (15C-02)는 80,904,586bp가 생산되어 총 268,786 reads를 얻었다 (표 77).

표 77. 곰팡이 ITS 메타지놈 시퀀스 생산 정보

Sample ID	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
한국산 대두 (15K-10)	271,124	57.5	42.5	78.009	69.246
중국산 대두 (15C-02)	268,786	57.448	42.55	76.903	68.231

㉕ 농산물 원산지 시료 별 차별화 미생물 군집 분석 및 필터링

NGS에 의해서 생성된 paired-end 형식의 염기서열자료 (reads)로부터 각 시료 당 두 개의 fastq 파일을 얻었다. PEAR software를 이용하여 하나의 fastq 파일로 합친 다음 Demultiplexed amplicon 염기서열을 제거한 후, quality scores가 30이하인 염기서열자료를 FastQC (v0.11.4)를 이용하여 제거하였다. Quality control을 통과한 염기서열자료를 QIIME 소프트웨어를 이용하여 이후 분석을 수행하였다. 각각의 read에 해당하는 operational taxonomic units (OTUs)는 sequence similarity가 0.97 이상인 것을 계산하여 분류하였으며, 진균의 경우에는 UNITE fungal ITS database(<https://unite.ut.ee/>)를 이용하여 알려진 진균 염기서열과 비교하였으며, 세균은 Greengenes 16S rRNA database (<http://greengenes.lbl.gov/Download/>)을 이용하여 align하였다. 그 결과 식물에 해당하는 염기서열자료들과 짧은 염기서열이나 두 개의 서로 다른 주형 (template)으로 구성된 chimera 염기서열 등을 제거한 후, 이 자료를 바탕으로 각 시료 내 OTU의 relative abundance와 alpha diversity는 MetaCoMET 웹 플랫폼을 이용하여 분석하였으며, beta diversity는 각 시료간의 군집 비교는 weighted Fast UniFrac을 R 프로그램을 이용하여 분석하였다 [(주)마크로젠 NGS분석팀 수행].



Process	Type	No. Contigs	Residues	Average	Minimum	Maximum	N50	Npct	GC
RDP	16S	3,070,243	3,199,489,195	1,042.10	400	2,922	1,356	0.1	54.1
Greengenes	16S	1,262,986	1,769,520,677	1,401.06	1,111	2,368	1,380	0.0	54.0
SILVA	16S+18S	4,346,329	3,879,609,400	892.62	300	3,999	1,343	0.0	53.7

그림 131. 염기서열을 보유하고 있는 database

그러나 그림 132 ~ 133에서와 같이 bacteria의 경우 대부분 unclassified로 blast 되었으며, fungi의 경우 no blast로 되어 silva ITS database (<https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>) 로 다시 분석하여 보았으나 또한 no blast 100%로 결과가 나왔다.

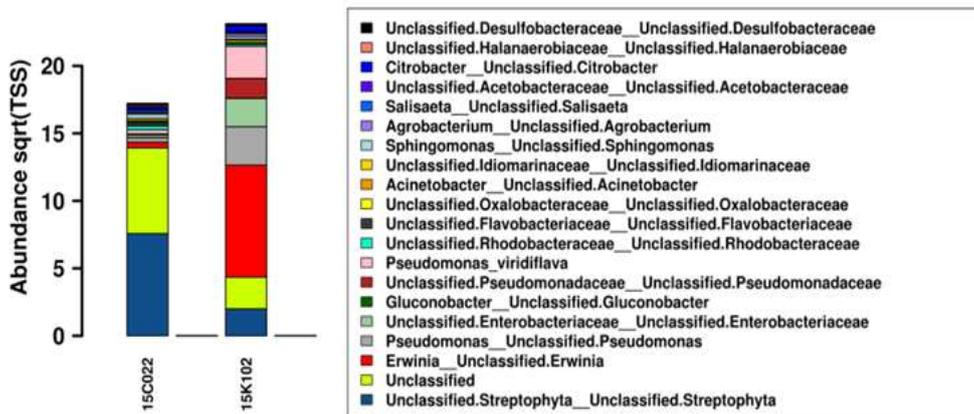


그림 132. 16S rRNA 분석으로 확인된 세균 metagenome 군집

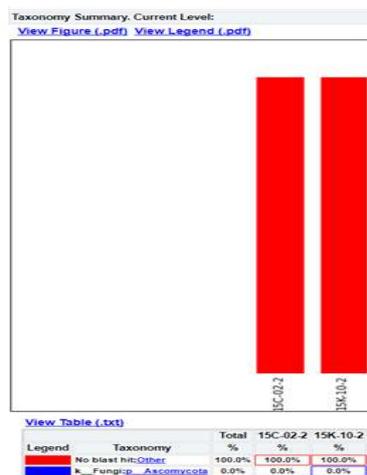


그림 133. ITS 분석으로 확인된 진균 metagenome 군집

NGS 기법으로 생산된 유전체 정보를 국내 메타지노믹스 서비스를 제공하는 마크로젠, 테라젠, 천랩 3회사에 보내어 분석을 의뢰하였으나, 모두 세균의 경우 대부분 plant로 blast되며 진균의 경우 no blast 100%라는 결과를 통보받았다. 유전체 정보 분석에 요구되는 수준의 유전체 정보가 생산 되었지만, 본 연구에서 요구하는 분석 결과를 제공하지 못하였다. 이는 기존 tool 프로그램의 manual화 된 일반적인 방법으로 분석하여 차별화된 미생물 군집 분석 및 필터링이 고려되지 않아 정확한 정보 분석 결과를 얻지 못한 것으로 예상된다. 따라서 본 연구팀에서 NGS로 생산된 DNA 시퀀스 데이터로 재가공하여 다른 방법으로 2차 분석을 수행하였다.

(마) 메타지노믹스 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 (community) 분석

① 기존 tool 활용하여 분류 (taxonomy) 및 Phylogenetic tree 분석

농산물 원산지 시료 별 차별화 미생물 군집 분석 및 필터링을 하기 위하여 NGS를 통해 유전체 정보를 생산하고 taxonomy 및 phylogenetic tree 분석을 시행하려 하였으나 기존 tool을 활용하여 분석하였을때 표 78과 같이 세균의 경우 대부분의 결과가 unclassified, 진균의 경우 no blast로 분석되어 taxonomy 및 phylogenetic tree 분석을 진행할 수 없었다.

표 78. 세균 taxonomy 및 phylogenetic tree 분석

Kingdom	Phylum	Class	Object	Family	Genus	15C-02-2	15K-10-2
Bacteria	Cyanobacteria	Chloroplast	Streptophyta			57.368%	3.955%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	mitochondria	Other	38.238%	0.511%
Unassigned	Other	Other	Other	Other	Other	1.803%	1.170%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0.074%	0.025%
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae		0.049%	0.015%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae		0.034%	0.005%
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Halanaerobiales	Halanaerobiaceae	Halanaerobium	0.039%	0.013%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	0.170%	68.873%
Bacteria	Bacteroidetes	[Rhodothermi]	[Rhodothermales]	Rhodothermaceae	Salisaeta	0.025%	0.002%
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae		0.010%	0.004%
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfohalobiaceae	Desulfovermiculus	0.018%	0.001%
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Halanaerobiales	Halanaerobiaceae		0.014%	0.007%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.235%	14.081%
Archaea	Euryarchaeota	Halobacteria	Halobacteriales	Halobacteriaceae	Halorubrum	0.012%	0.004%
Bacteria	Bacteroidetes	[Rhodothermi]	[Rhodothermales]	Rhodothermaceae	Salinibacter	0.020%	0.003%
Bacteria	Cyanobacteria	Chloroplast	Stramenopiles			0.011%	0.004%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Other	0.240%	1.209%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	0.010%	0.001%
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	SB-1		0.002%	0.005%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria				0.005%	0.001%

② 기존 tool의 문제점 보완 및 프로그램 코딩

기존에 확립한 방법을 토대로 분석해본 결과 soybean gDNA에서 증폭된 것들이 많이 발견되었고 계통이 불확실하게 분류된 것들의 비율이 높아서 이들을 보완할 필요가 있어서 분석방법을 보완했다. 대두 gDNA에서 증폭된 reads를 제거하기 위해서 fastq_to_fasta program을 이용해서 fasta format으로 변환한 다음에 short DNA sequence들의 분석에 유용한 fr-hit를 이용해서 homology search를 했다. 자체 제작한 python script를 이용하여 host gDNA와 높은 identity를 보이는 reads들을 제거하여 미생물에서만 얻어진 metagenome reads를 얻었다. SPAdes assembler로 이들을 assemble하여 high-quality contig들을 얻었다. NCBI의 16S microbial DNA

sequence database와 ISHAP ITS Database (its.mycologylab.org)를 이용하여 blast homology search 분석을 했고, 이를 토대로 taxonomy classification을 할 수 있는 python script를 자체 제작 하였다. fungal sp. 나 unknown 처럼 불확실하게 분류된 database sequence가 먼저 match 된 경우에는 보다 확실하게 분류된 다음 sequence의 taxonomy를 이용할 수 있게 하여 미생물 군집의 계통도 분석을 보다 용이하게 하였고, NCBI의 ete3 toolkit을 이용하여 계통도 분석결과를 계-문-강-목-과-속-종에 따라 분석하기 용이하게 하였다. 개략적인 분석파이프라인은 아래 그림 135과 같다.

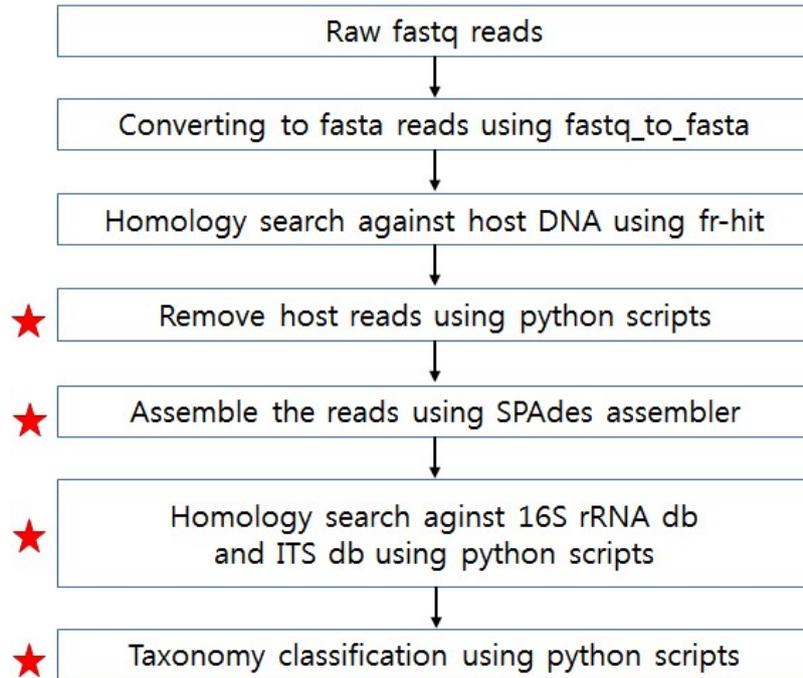


그림 134. 세균 16S rRNA와 진균 ITS metagenome 군집분석 파이프라인
(★ 본 연구에서 시도한 방법)

(바) 메타지놈 시퀀스로부터 차별화되는 미생물 군집의 필터링 방법 확립

① 원산지별 미생물 군집의 정량, 정성적 분석을 통해 상이한 미생물 군집 선별

② 기존 tool의 문제점 보완한 Lotus pipeline을 활용한 필터링

Illumina MiSeq 방법으로 세균 16S rRNA 지역을 분석한 결과, 중국산과 국내산 대두에서 각각 145,131 reads, 154,146 reads를 얻었는데, 대두의 미생물 gDNA reads를 필터링한 결과 중국산에서는 5,553개와 국내산에서는 144,727 reads만 남았다. 한편, 같은 방법으로 진균 ITS 지역을 분석한 결과 중국산과 국내산에서 각각 134,393, 135,562 reads를 얻었는데, 역시 대두의 미생물 gDNA reads를 필터링한 결과 중국산에서는 3,187개, 국내산에서는 23,325개의 reads만 남았다 (표 79).

표 79. 세균 16S rRNA와 진균 ITS NGS reads 필터링 결과

	bacterial 16S		fungi ITS	
	중국산	국내산	중국산	국내산
raw reads	145,131	154,146	134,393	135,562
host filtered reads	5,553	144,727	3,187	23,325
% microbial reads	3.8%	93.9%	2.4%	17.2%

대두의 gDNA에서 유래된 reads가 많이 증폭된 것은 세균 16S rRNA 지역 primer들이 식물의 chloroplast나 mitochondrial 16S rRNA 지역과 유사하고 진균 ITS 지역 primer들이 식물 chromosomal ITS 지역과 유사한데서 기인하는 것으로 확인되었는데 (그림 135, 그림 136),

```
>>chl16S (1491 nt)
initn: 76 init1: 76 opt: 76 Z-score: 124.4 bits: 29.2 E(2): 9.4e-05
banded Smith-Waterman score: 76; 88.2% identity (94.1% similar) in 17 nt overlap (1-17:312-328)
.
.
519F
      10
      CCTACGGGNGGCWGCAG
      .....
chl16S CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
      290      300      310      320      330      340
chl16S GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGGAGCAATGCCCGTGAAGGTAGAAGGCCTACGGGTCATG
      350      360      370      380      390      400

>>chl16S (1491 nt)
rev-comp initn: 97 init1: 97 opt: 97 Z-score: 150.8 bits: 34.4 E(2): 3.2e-06
banded Smith-Waterman score: 97; 90.5% identity (100.0% similar) in 21 nt overlap (21-1:733-753)
.
.
806R-
      20      10
      GGATTAGATACCCBDGTAGTC
      .....
chl16S ACTGAGAGACGAAAGCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTA
      710      720      730      740      750      760
chl16S AACGATGGATACTAGGCGCTGTGCCTATCGACCCGTGCAATGCTGTAGCTAACGCGTTAA
      770      780      790      800      810      820
```

그림 135. 16S rRNA primer들과 soybean chloroplast DNA homology 분석결과

```

>>NC_016100.2 chromosome 13 (45874162 nt)
rev-comp initn: 91 init1: 91 opt: 91 Z-score: 102.3 bits: 32.0 E(7615): 4.5
banded Smith-Waterman score: 91; 95.0% identity (95.0% similar) in 20 nt overlap (20-1:3747731-3747750)

ITS3F-
      20      10
      GCTGCGTTCTTCATCGATGC
      ::: :
NC_016 TTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCPAGAGCCGAG
      3747710 3747720 3747730 3747740 3747750 3747760
NC_016 ATATCCGTTGCCGAGAGTCAATTGTATGTAAATGTTGTGTCGTGACCGACTCCCGCGGGACA
      3747770 3747780 3747790 3747800 3747810 3747820

>--
: initn: 100 init1: 100 opt: 100 Z-score: 264.4 bits: 62.0 E(7615): 4.2e-09
banded Smith-Waterman score: 100; 100.0% identity (100.0% similar) in 20 nt overlap (1-20:3747350-3747369)

ITS4R
      10      20
      TCCTCCGCTTATTGATATGC
      .....
NC_016 GTTACTAAGGGAATCCTTGTAGTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAACTCAG
      3747320 3747330 3747340 3747350 3747360 3747370
NC_016 CGGGTAGCCCCGCTGACCTGAGGTCTCGTTGGGAGCGTGCCTGCACCCAAAGGGTCCGTC
      3747380 3747390 3747400 3747410 3747420 3747430

```

그림 136. ITS primer들과 soybean genomic DNA homology 분석결과

중국산과 국내산 대두의 세균 16S와 진균 ITS 지역에서 서로 다르게 필터링되는 것은 추출된 미생물의 양이 서로 차이가 나는 것으로 추정된다. 특히, 중국산은 세균 16S rRNA와 진균 ITS reads의 비율이 3.8%와 2.4%로 매우 적는데, 좀더 많은 미생물 메타지놈이 포함되도록 추출과정을 개선할 필요가 있다. 한편 숙주 DNA sequence가 증폭될 우려가 큰 기존의 16S rRNA primer들과 ITS primer들을 대체하기 위한 primer set 제작도 시도하였다.

④ NCBI reference material을 이용한 재분석

기존 tool의 문제점 보완한 Lotus pipeline을 이용하여 재분석하고, NCBI nr database와 microbial 16S RNA database 대신 NCBI에서 reference material을 이용하여 만든 16S ribosomal RNA sequence database와 fungi type ITS database를 이용하여 기존보다 정확한 종동정을 하였다.

표 80. Lotus pipeline를 이용한 세균 16S rRNA 및 진균 ITS 필터링 결과

	bacterial 16S		fungul ITS	
	중국산	국내산	중국산	국내산
Raw reads	144,299	153,244	134,393	135,562
OTU_nums	35	25	34	52
OTU_nums_host_filtered	30	23	34	52
OTU_aligned_reads	43,921	65,470	1,633	11,834
OTU_aligned_reads_host_filtered	772	62,660	1,633	11,834
% microbial reads	0.54%	40.89%	1.22%	8.73%

Lotus pipeline을 이용해서 얻어진 OTU에 align된 reads (표 80) raw data를 대두 gDNA에 매칭시켜 분석한 결과 (표 79)의 절반 정도로 나타났는데, 이는 sequence quality 문제에 따른 chimera, replicated reads 등과 대두 DNA 오염 때문으로 보인다. 국내산 대두에서 얻어진 미생물 군집의 OTU들은 통계적으로 유의미한 수준의 reads를 얻었지만, 중국산 대두에서 얻어진 OTU들은 reads가 너무 적어 두 집단을 동일수준으로 비교하기에는 무리가 있다. 이는 미생물 군집의 gDNA를 얻기 어려운 대두 구조적 특징과 universal primer들이 농산물 자체 gDNA의 과증폭하는 특징에 의한 것으로 개선하기 위하여 향후 농산물부터 microbial DNA에 specific한 primer들을 사용하였다.

1) 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석

대두의 미생물 gDNA를 이용하여 얻은 미생물 군집의 세균의 종분포는 표 81, 그림 138과 같은데, 한국산에서는 *Pantoea vagans*가 91.40%로 가장 많았으며, *Pseudomonas Coleopterorum*과 *Pseudomonas circhorii*가 5.39%, 2.03%를 차지하고 나머지 종들의 비율은 미미한 수준인 것으로 분석되었다. 중국산은 얻은 reads수가 너무 적어 통계적으로 유의미한 비교분석은 어렵지만, *Erwinia rhapontici*가 24.50%, *Rhodoligotrophos appendicifer*가 16.60%, *P. coleopterorum*가 14.60%로 순서로 분포하고 있으며, 나머지 종들도 상대적으로 높은 비율로 존재하는 것으로 분석되었다.

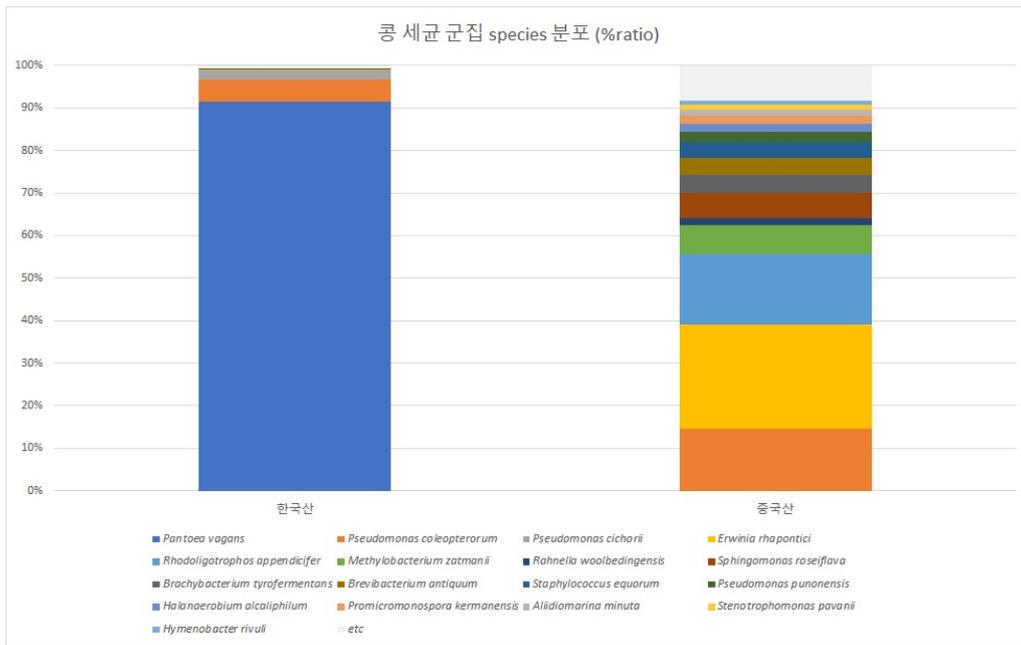


그림 137. 16S rRNA 분석을 통한 대두 세균 species 분포도 (%ratio)

표 81. 16S rRNA 분석을 통한 대두 세균군집 species 분포

Species	국내산		중국산	
	Reads	%	Reads	%
<i>Pantoea vagans</i>	57,283	91.40%	0	0.00%
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	3,379	5.39%	113	14.60%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	1,273	2.03%	0	0.00%
<i>Erwinia rhapontici</i>	115	0.18%	189	24.50%
<i>Rhodoligotrophos appendicifer</i>	0	0.00%	128	16.60%
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	70	0.11%	52	6.74%
<i>Rahnella woolbedingensis</i>	94	0.15%	13	1.68%
<i>Sphingomonas roseiflava</i>	31	0.05%	45	5.83%
<i>Brachy bacterium tyrofermentans</i>	0	0.00%	34	4.40%
<i>Brevibacterium antiquum</i>	0	0.00%	30	3.89%
<i>Staphylococcus equorum</i>	0	0.00%	29	3.76%
<i>Pseudomonas punonensis</i>	0	0.00%	19	2.46%
<i>Halanaerobium alcaliphilum</i>	0	0.00%	15	1.94%
<i>Promicromonospora kermanensis</i>	0	0.00%	14	1.81%
<i>Aliidiomarina minuta</i>	0	0.00%	11	1.42%
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	0	0.00%	8	1.04%
<i>Hymenobacter rivuli</i>	0	0.00%	8	1.04%

국내산 대두는 *P. vagans*가 90%이상 분포하는 세균 군집층이 안정적으로 형성되어 일정수준 이상의 세균유래 gDNA를 얻었던 반면, 중국산 대두은 생산, 보관, 유통과정 중에서 이런 세균 군집층이 사라져버려 세균 유래 DNA의 양이 적어 대두의 염색체나 미토콘드리아 유래의 16S DNA에 의한 오염이 더 심하게 나타난 것으로 보인다.

2) 진균 ITS 미생물 군집 분석

대두의 미생물 gDNA를 이용하여 얻은 미생물 군집의 진균의 종분포는 표 82, 그림 139와 같다. 한국산 대두에서는 *Aspergillus vitricola*가 49.80%, *Cladosporium welwitschiicola*가 28.30%로 분포하는 반면, 중국산은 *Boeremia foveata*가 37.20%, *C. welwitschiicola*가 16.50%, *Cercospora cyperina*가 10.40%로 분포하였는데, 세균에서와 마찬가지로 중국산은 절대적인 reads수가 적기 때문에 비교분석에 유의미하지 않을수 있다. 다만, 세균과 마찬가지로 실험에 사용한 중국산 대두에서는 생산, 보관, 유통과정에서 진균군집층 대부분이 사라져서 얻어진 DNA 중 대두의 gDNA 비율이 높아진 것으로 보인다.

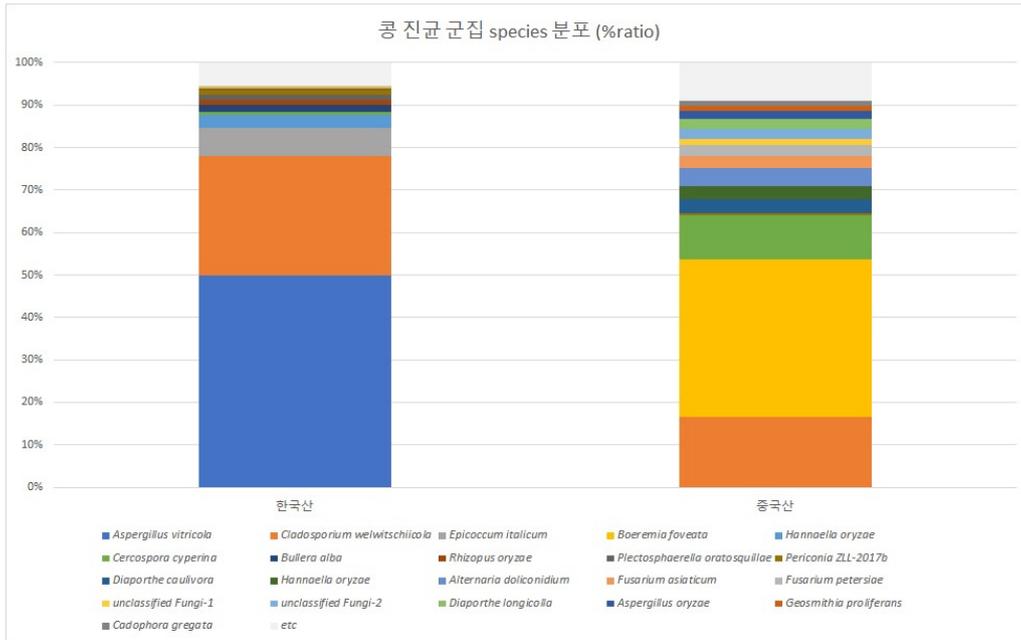


그림 138. ITS 분석을 통한 대두 진균군집 species 분포 (%ratio)

국내산과 중국산 대두에서 공통으로 발견되는 *C. welwitschiicola*은 전세계적으로 유기 및 무기 물질에서 일반적으로 발견되고 공기중에 효율적으로 분포한다고 알려진 *C. herbarum* 계통으로 ITS sequence 상 100% 일치한다. 한국산에서 50% 가까이 존재하지만 중국산에서는 발견되지 않은 *A. vtricola*는 극한의 건조조건에서 견딜수 있는 *xerophilic aspergilli*에 속한다고 알려져 있다. 반면에 *B. foveata*는 감자의 괴사 (gangrene)를 일으키는 식물병원성 곰팡이로 알려져있고, *C. cyperina* 역시 중요한 식물 병원성 곰팡이로 알려져 있는데, 이런결로 유추해볼때 분석에 사용한 한국산 대두은 건조에 강한 *A. vitricola*나 *Cladosporium*속 곰팡이들이 주로 분포하는 건강한 종자인 반면, 중국산 대두은 병증이 이미 있거나 병이 유발될 수 있는 가능성이 있는 종자일 가능성이 크다.

표 82. ITS 분석을 통한 대두 진균 균집 species 분포

species	국내산		중국산	
	Reads	%	Reads	%
<i>Aspergillus vitricola</i>	5,890	49.80%	-	0.00%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	3,344	28.30%	270	16.50%
<i>Epicoccum italicum</i>	774	6.54%	-	0.00%
<i>Boeremia foveata</i>	-	0.00%	07	37.20%
<i>Hannaella oryzae</i>	369	3.12%	-	0.00%
<i>Cercospora cyperina</i>	75	0.63%	170	10.40%
<i>Bullera alba</i>	206	1.74%	-	0.00%
<i>Rhizopus oryzae</i>	139	1.17%	-	0.00%
<i>Plectosphaerella oratosquillae</i>	137	1.16%	-	0.00%
<i>Periconia ZLL-2017b</i>	126	1.06%	8	0.49%
<i>Diaporthe caulivora</i>	22	0.19%	54	3.31%
<i>Hannaella oryzae</i>	25	0.21%	48	2.94%
<i>Alternaria doliconidium</i>	-	0.00%	72	4.41%
<i>Fusarium asiaticum</i>	23	0.19%	44	2.69%
<i>Fusarium petersiae</i>	18	0.15%	43	2.63%
<i>unclassified Fungi-1</i>	21	0.18%	22	1.35%
<i>unclassified Fungi-2</i>	-	0.00%	42	2.57%
<i>Diaporthe longicolla</i>	-	0.00%	36	2.20%
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	0.00%	32	1.96%
<i>Geosmithia proliferans</i>	-	0.00%	21	1.29%
<i>Cadophora gregata</i>	-	0.00%	18	1.10%

(3) 농산물 참깨의 미생물 gDNA를 활용하여 메타지놈 시퀀스 생산 및 미생물 균집 분석

(가) 원산지 판별 대상 농산물 참깨 시료 수집

① 국내 원산지 판별 대상 참깨 시료 수집

국내 원산지 판별을 위한 참깨 시료로 2017년에 생산된 경기, 강원, 충남, 충북, 경북, 경남, 전북, 전남, 제주 9개도의 참깨 총 38점을 국립농산물품질관리원으로부터 제공 받았다 (표 83). 추가적으로 2017년도 통계청 자료 기준, 국내 참깨 생산량의 70%를 차지하는 전남 (24.7%), 경북 (22.2%)에서 생산지와 생산자가 명시된 전남 진도, 나주, 해남 3지역, 경북 김천, 예천, 영양 3지역에서 생산된 시료를 구입하여 Biological triplicate를 위한 시료를 확보하였고 총 44개 참깨시료로부터 미생물 total DNA를 추출하였다.

표 83. 국내 원산지 판별을 위한 참깨 시료 목록

NO.	도	시군	시료번호	NO.	도	시군	시료번호
1	경남	진주	17k-09	24	전남	광주	17k-14
2	경남	진주	17k-11	25	전남	나주	17K-S5*
3	경남	창원	17k-24	26	전남	목포	17k-12
4	경남	합안	17k-03	27	전남	무안	17k-13
5	경남	합천	17k-06	28	전남	여수	17k-10
6	충남	공주	17k-15	29	전남	진도	17K-S4*
7	충남	당진	17k-05	30	전남	해남	17K-S6*
8	충남	대전	17k-35	31	경북	김천	17K-S1*
9	충남	서천	17k-16	32	경북	안동	17k-27
10	충북	괴산	17k-28	33	경북	안동	17k-36
11	충북	청주	17k-32	34	경북	영양	17K-S3*
12	충북	청주	17k-34	35	경북	영주	17k-31
13	충북	충주	17k-38	36	경북	영주	17k-33
14	경기	강화	17k-37	37	경북	영천	17k-01
15	경기	고양	17k-25	38	경북	예천	17K-S2*
16	경기	김포	17k-26	39	경북	칠곡	17k-29
17	경기	이천	17k-07	40	전북	남원	17k-02
18	경기	양평	17k-22	41	전북	완주	17k-18
19	경기	이천	17k-08	42	전북	익산	17k-19
20	경기	파주	17k-21	43	전북	임실	17k-04
21	제주	제주	17k-20	44	전북	전주	17k-17
22	강원	인제	17k-30	* 생산지 생산자 명시된 구입시료			
23	강원	춘천	17k-23				

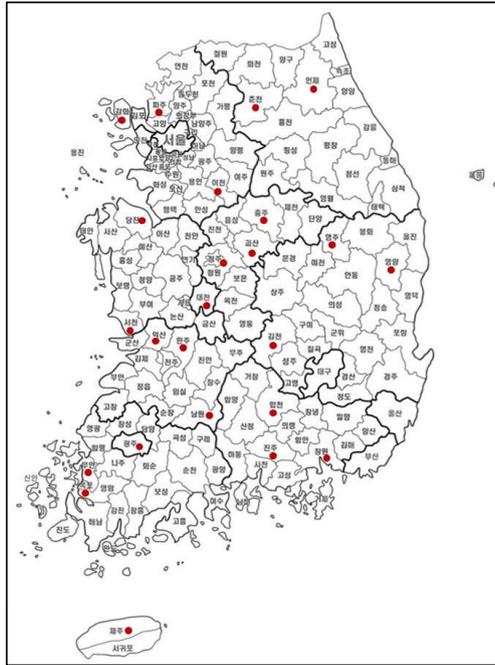


그림 139. 국내 원산지 판별 대상 참깨 시료 수집 위치

② 중국 원산지 판별 대상 참깨 시료 수집

중국 원산지 판별을 위한 시료로 2017년에 생산된 참깨 총 6점을 주관 기관 (이화여대)으로부터 제공받아, 생산지역의 기후에 따라 구분하고 (표 84) 참깨 시료로부터 미생물 total DNA를 추출하였다.

표 84. 중국 원산지 판별을 위한 참깨 시료 목록

번호	지역	시료번호
1	흑룡강성	17C-01
2	길림성	17C-02
3	하남성	17C-03
4	안휘성	17C-04
5	운남성	17C-05
6	광서장족자치구	17C-06



그림 140. 중국 원산지 판별 대상 참깨 시료 수집 위치

③ 외국인산 국내 원산지 판별 참깨 시료 수집

외국산 원산지 판별을 위한 시료로 2017년에 생산된 총 6점을 주관기관으로부터 제공받아, 그 중 중국을 제외 (주관기관으로부터 지명이 표시된 시료가 확보되어) 5개 지역의 참깨시료로부터 미생물 total DNA를 추출하였다 (표 85).

표 85. 외국인산 원산지 판별을 위한 시료

번호	지역	시료번호
1	에디오피아	Ethiopia
2	나이지리아 C	Nigeria C
3	나이지리아 O	Nigeria O
4	파키스탄	Pakistan
5	인도	India
6	중국	China



그림 141. 외국인산 원산지 판별 대상 참깨 시료 수집 위치

(나) 미생물 DNA 추출법 개선 및 비교 분석

① 연구 수행 방법

본 연구에서는 대상 농산물의 특성과 미생물의 특성, 즉 부생적으로 농산물 겉면의 환경으로부터 유래한 미생물 군집, 농산물 (작물) 세포 내부에 기생 또는 공생을 하는 미생물 군집을 분석하는 것이 목적이다. 따라서 대상 농산물 (식물) 자체의 genomic DNA (gDNA)가 최대한 혼입되지 않고 순도가 높은 미생물 total DNA를 확보하는 것이 관건이다. 2차년도에 연구 결과를 바탕으로 확립한 효율이 높은 phosphate-buffered saline (PBS) 여과 방법과 PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO, cat# 12855-50)를 이용하여 참깨의 겉면으로부터 기인하여 군집을 이루고 있는 미생물의 DNA를 추출하였다. 그림 143에 참깨로부터 미생물 total DNA를 추출하는 과정을 도시하였다.



그림 142. 참깨로부터 미생물 total DNA 추출 과정

농산물 자체의 gDNA가 최대한 혼입되지 않게 미생물 total DNA를 확보하기 위하여 표 86와 같이 3가지 전처리 방법을 시행하였다.

표 86. 참깨 전처리법 조건

No.	전처리법	소요시간
1	참깨 100g + PBS buffer 400mL 4°C 에서 24시간 침지	30시간
2	참깨 50g + PBS buffer 200mL 4°C 에서 24시간 침지	28시간
3	참깨 50g + PBS buffer 400mL 4°C 에서 24시간 침지	30시간

표 86와 같이 같이 참깨를 3가지 방법으로 전처리하여, 25° C, 180 rpm 1시간 진탕하였다. 진탕한 PBS buffer를 공극 크기 100 μm의 cheesecloth filter로 여과한 후 13,000rpm, 10분간 원심 분리한 Pellet을 PowerSoil gDNA extraction kit으로 미생물 total DNA 추출하였다. Nanodrop (Thermofisher, USA)으로 미생물 total DNA의 농도를 측정 후 표 87의 primer set으로 세균과 진균 대상 유전자 유무를 확인하기 위하여 PCR 증폭하고 전기영동으로 확인하였다.

표 87. 참깨 유래 미생물 total DNA로부터 세균, 진균 확인을 위한 primer 목록

Target	Name	Sequences	Ref.
Bacteria	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Britschgi <i>et al.</i> (1998)
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
Fungi	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	white <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Chloroplast	cp103F	GCATCCATGGCTGAATGG	Yang <i>et al.</i> (2015)
	cp103R	CAAAGAAGAGTTTCGACCCA	

② 연구 결과

참깨 100g을 PBS buffer 400mL에 넣고 4°C에서 24시간 동안 침지 (전처리 1)하여 미생물 total DNA를 추출한 경우 농도는 12ng/ul으로 메타지놈시퀀싱이 가능하나 시료량에 비해 total DNA 농도가 낮았다. 25°C 1시간 동안 진탕시 충분히 현탁이 되지 않는 전처리 1 방법을 보완하기 위하여 참깨 50g을 PBS buffer 200mL에 넣고 침지하여 미생물 total DNA를 추출한 (전처리 2) 경우와 참깨 50g을 PBS buffer 400mL에 넣고 침지하여 미생물 total DNA를 추출하였다 (전처리 3). 전처리 2의 미생물 total DNA 농도는 31.6 ng/ul, 전처리 3의 미생물 total DNA 농도는 35.2 ng/ul으로 방법 1과 비교하여 total DNA량이 두배로 증가하였다. 하지만 전처리 2의 경우 전처리 시간이 2시간 정도 줄어 좀더 효율적이였다. 표 88에 전처리법에 따른 참깨 시료의 미생물 total DNA의 농도를 정리하였다.

표 88. 원산지 판별을 위한 전처리법에 따른 참깨 시료의 미생물 total DNA 농도

전처리 방법	시료량/Buffer량	DNA 농도 (ng/μl)	260/280nm*	DNA amplicon (ITS, ng/uL)	DNA amplicon (16S, ng/uL)	장단점
1	100g/400mL	12	1.925	524	488	시료량이 많아 Shaking 어려움
2	50g/200mL	31.6	1.798	528	402	전처리 소요시간 및 total DNA농도결과 가장 효율적
3	50g/400mL	32.5	1.749	499	395	Buffer량이 2배로 전처리 시간 많이 소요

*260/280nm (NanoDrop 측정값) : DNA 순도 또는 품질에 대한 지표

전처리 2 방법으로 추출한 참깨시료의 미생물 total DNA 농도를 정리하였다 (표 89).

표 89. 원산지 판별을 위한 참깨 시료의 미생물 total DNA 농도

NO.	도	시군	시료번호	DNA농도 (ng/μl)	NO.	도	시군	시료번호	DNA농도 (ng/μl)
1	경남	진주	17k-09	0	31	경북	김천	17K-S1*	70
2	경남	진주	17k-11	6	32	경북	안동	17k-27	13
3	경남	창원	17k-24	7	33	경북	안동	17k-36	1
4	경남	함안	17k-03	4	34	경북	영양	17K-S3*	33
5	경남	합천	17k-06	26	35	경북	영주	17k-31	5
6	충남	공주	17k-15	2	36	경북	영주	17k-33	72
7	충남	당진	17k-05	3	37	경북	영천	17k-01	6
8	충남	대전	17k-35	9	38	경북	예천	17K-S2*	13
9	충남	서천	17k-16	13	39	경북	칠곡	17k-29	7
10	충북	괴산	17k-28	4	40	전북	남원	17k-02	36
11	충북	청주	17k-32	6	41	전북	완주	17k-18	64
12	충북	청주	17k-34	3	42	전북	익산	17k-19	41
13	충북	충주	17k-38	5	43	전북	임실	17k-04	6
14	경기	강화	17k-37	8	44	전북	전주	17k-17	11
15	경기	고양	17k-25	2	45		흑룡강성	17C-01	0.147
16	경기	김포	17k-26	3	46		길림성	17C-02	2.674
17	경기	이천	17k-07	10	47		하남성	17C-03	5.735
18	경기	양평	17k-22	0	48		안휘성	17C-04	4.951
19	경기	이천	17k-08	3	49		운남성	17C-05	11.42
20	경기	파주	17k-21	7	50		광서장족자치구	17C-06	2.892
21	제주	제주	17k-20	4	52		Ethiopia		4
22	강원	인제	17k-30	8	53		Nigeria C		3
23	강원	춘천	17k-23	6	54		Nigeria O		3
24	전남	광주	17k-14	16	55		Pakistan		4
25	전남	나주	17K-S5*	4	56		India		8
26	전남	목포	17k-12	16					
27	전남	무안	17k-13	19					
28	전남	여수	17k-10	8					
29	전남	진도	17K-S4*	3					

한국산 시료의 미생물 total DNA 농도는 0 ~70ng/ul, 중국산 시료 0.2~11.4ng/ul, 외국산 시료 3 ~8ng/ul으로 편차가 큼을 확인하수 있었다. 참깨 수확 후 껍질과 줄기 등의 불순물만 제거하여 판매하는 제품부터 물로 세척하여 건조기로 말려 판매하는 청결한 상품까지 다양하여 참깨시료의 미생물 total DNA 농도가 편차가 큼을 확인할수 있었다. 미생물 균집 분석을 위하여 44개의 한국산 참깨 시료 중 각 도별로 미생물 total DNA 농도가 높은 3개씩을 선별하여 총 25개, 중국산 시료 6개, 외국산 5개 시료를 (주)마크로젠에 시료를 의뢰하였으며 NGS Library QC 결과 표 90와 같이 통과하였다.

표 90. 원산지 판별을 위한 참깨 시료의 Metagenome Amplicon 농도

NO.	도	시군	시료번호	ITS amplicon (ng/ul)	16S amplicon (ng/ul)
1	경남	진주	17k-09	96.29	87.31
2	경남	창원	17k-24	87.98	83.36
3	경남	합천	17k-06	99.22	85.61
4	충남	당진	17k-05	54.73	87.24
5	충남	대전	17k-35	83.54	84.43
6	충남	서천	17k-16	88.35	77.98
7	충북	괴산	17k-28	78.77	80.01
8	충북	청주	17k-32	103.48	68.25
9	충북	충주	17k-38	92.35	79.64
10	경기	강화	17k-37	49.66	77.46
11	경기	이천	17k-07	82.36	78.67
12	경기	파주	17k-21	71.65	71.88
13	제주	제주	17k-20	96.32	73.54
14	강원	인제	17k-30	86.65	71.94
15	강원	춘천	17k-23	69.2	93.06
16	전남	광주	17k-14	80.83	72.43
17	전남	목포	17k-12	66.45	84.52
18	전남	무안	17k-13	74.94	84.43
19	전남	진도	17K-S6*		
20	경북	김천	17K-S1*	78.81	86.45
21	경북	영양	17K-S3*	81.43	84.77
22	경북	영주	17k-33	30.88	75.18
23	전북	남원	17k-02	67.53	84.68
24	전북	완주	17k-18	79.32	78.14
25	전북	익산	17k-19	49.92	80.8
26		흑룡강성	17C-01	13.18	46.67
27		길림성	17C-02	85.58	84.22
28		하남성	17C-03	41.46	86.75
29		안휘성	17C-04	78.42	89.83
30		운남성	17C-05	60.82	84.13
31		광서장족자치구	17C-06	45.34	47.4
32		Ethiopia	Ethiopia	88.37	73.16
33		Nigeria C	Nigeria C	88.99	74.32
34		Nigeria O	Nigeria O	76.02	61.32
35		Pakistan	Pakistan	98.68	72.06
36		India	India	93.68	59.46

(다) 농산물 참깨로부터 선택배지 활용한 상이한 미생물 (진균류)군의 선택적 분리 및 동정

① 연구 수행 방법

미생물 total DNA를 추출하기 위하여 전처리 한 참깨시료를 PBS buffer에 침지하여 미생물 total DNA를 추출하기 위하여 얻은 미생물 pellet을 1mL PBS buffer에 현탁하여 진균 선택 배지인 Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC배지 ; Peptone 0.5%, Glucose 1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 0.2% Dichloran 1.0 ml, Rose bengal 0.0025%, Chloramphenicol 0.01%, Agar 1.5%)고체평판 배지에 100 μL씩 도말하여 25°C 에서 5일간 관찰하였다. 그리고 미생물 균집 분석 후 유의미한 미생물을 분리 동정하기 위하여 100 μL를 20% glycerol에 현탁하여 -80°C 에 보관하였다.

② 연구 결과

본 연구에 원산지 관별을 위한 참깨 시료는 식량자원으로 시장에서 먹거리로 판매되는 상품이므로, 참깨의 겉표면이나 내생하고 있는 미생물의 농도가 낮을 것으로 예상하고, NGS 기법으로 정보를 생산하여 분석한 미생물균집에서 얻은 결과와 비교하여 유용한 미생물을 분리·동정하고 그 결과로부터 유용한 유전자를 선별하기 위하여 시도하였다. 2차년도 대두 시료의 미생물 total DNA 농도는 2~6ng/uL로 선택배지에 미생물의 배양하기에 낮은 농도로 판단되어 균주 분리 및 동정은 불가능하였다. 따라서 참깨 시료 (전남 해남 17K-S6)에서는 50g으로부터 얻은 미생물 pellet의 현탁액을 도말하여 그림 144과 같이 미생물이 존재하는 것을 확인하였고 광학현미경 (x400)에서 관찰하여 본 결과 *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. 등 사상성 곰팡이가 관찰되었다 (그림 144). 따라서 미생물 균집 분석 후 유의미한 미생물을 분리 동정할수 있도록 현탁액을 -80°C에 보관하였다.

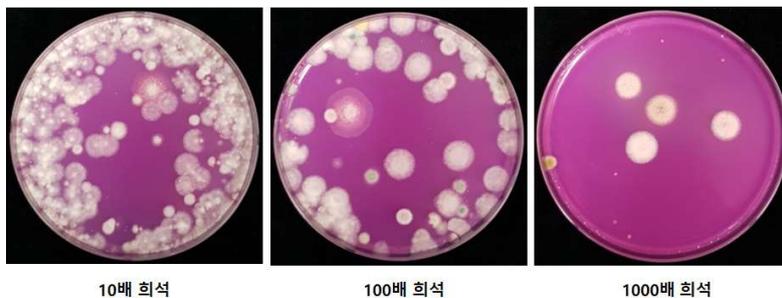


그림 143. 선택배지 DRBC에 도말한 전남 해남 (17K-S6) 시료의 미생물 colony

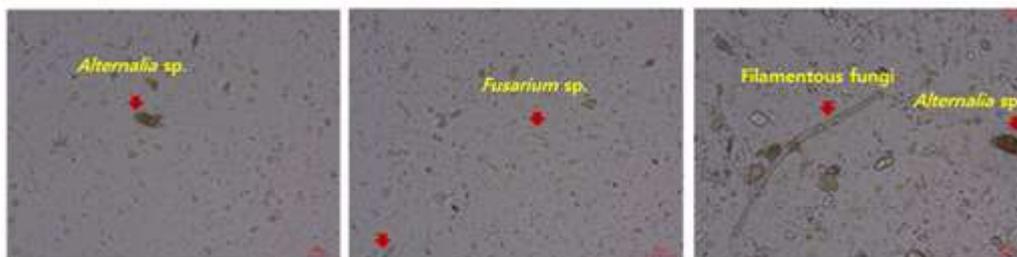


그림 144. 전남 해남 (17K-S6) 시료의 미생물 광학현미경 관찰

(라) 메타지놈 시퀀스 데이터 생산, 분석 및 가공

① NGS 기법에 의한 유전체 정보 생산

㉓ 연구 수행 방법

참깨에서 추출한 미생물 total DNA는 (주)마크로젠에 메타지노믹스 서비스를 의뢰하여 시퀀싱하고 분석을 수행하였다. NGS library 제작을 위한 PCR은 진균의 internal transcribed spacer 2 (ITS2) 지역을 증폭시켰고, 세균은 16S rRNA 유전자의 V3~V4 부분을 증폭시켰다. 이를 Illumina사의 MiSeq 플랫폼을 이용하여 차세대염기서열분석법 (NGS)으로 시퀀싱하고 분석을 수행하였다.

㉔ 연구 결과

참깨의 원산지별 미생물 군집을 분석하기 위하여 NGS 방법에 의해 세균 군집분석을 위한 16S rRNA 메타지놈은 국내산 25개, 중국산 6개, 기타 해외산 5개 등 총 36개의 시료에서 총 6,187,299쌍의 paired-end reads를 얻었는데, ITS 메타지놈과 달리 라이브러리에 따라 참깨에서 유래된 chloroplast 혹은 mitochondrial reads가 미미하게 혼합되었지만, 대두보다는 매우 양호한 결과를 얻을 수 있었다 (표 91).

표 91. 참깨의 세균 16S 메타지놈 시퀀스 생산 정보

Sample	Total Bases	Read Count	Read Count	GC (%)	Q20 (%)
17K-02-V	95,950,372	318,772	159,386	54.93	91.94
17K-05-V	102,172,644	339,444	169,722	55.31	92.10
17K-06-V	103,835,368	344,968	172,484	54.31	92.45
17K-07-V	112,717,276	374,476	187,238	54.01	91.03
17K-09-V	107,274,594	356,394	178,197	54.04	91.53
17K-12-V	106,115,744	352,544	176,272	54.42	91.88
17K-13-V	109,216,044	362,844	181,422	54.90	91.71
17K-14-V	99,824,242	331,642	165,821	54.68	92.01
17K-16-V	104,315,162	346,562	173,281	54.88	91.87
17K-18-V	106,724,366	354,566	177,283	54.88	91.91
17K-19-V	113,241,016	376,216	188,108	55.0	92.14
17K-20-V	109,348,484	363,284	181,642	54.50	92.18
17K-21-V	101,992,044	338,844	169,422	54.32	91.83
17K-23-V	100,240,826	333,026	166,513	55.30	92.12
17K-24-V	112,457,212	373,612	186,806	54.77	91.59
17K-28-V	99,968,120	332,120	166,060	54.33	92.44
17K-30-V	103,340,524	343,324	171,662	54.21	91.76
17K-32-V	100,943,360	335,360	167,680	55.45	90.94
17K-33-V	101,791,578	338,178	169,089	54.61	92.46
17K-35-V	118,994,330	395,330	197,665	54.59	91.35
17K-37-V	92,856,694	308,494	154,247	52.77	91.17
17K-38-V	113,844,220	378,220	189,110	54.18	91.71
17K-S1-V	106,144,640	352,640	176,320	55.0	92.19
17K-S3-V	100,049,992	332,392	166,196	55.10	91.13
17C-01-V	136,510,724	453,524	226,762	54.09	90.71
17C-02-V	103,207,482	342,882	171,441	55.88	91.87
17C-03-V	106,954,330	355,330	177,665	55.61	92.55
17C-04-V	107,126,502	355,902	177,951	54.74	92.29
17C-05-V	91,532,294	304,094	152,047	54.73	91.40
17C-06-V	122,001,922	405,322	202,661	55.64	91.89
Ethiopia-V	83,122,956	276,156	138,078	55.15	90.07
India-V	111,029,268	368,868	184,434	55.74	91.22
Nigeria-C-V	112,832,860	374,860	187,430	55.31	91.37
Nigeria-O-V	112,802,158	374,758	187,379	54.98	91.40
Pakistan-V	114,274,650	379,650	189,825	55.82	89.65

ITS 메타지놈은 국내산 25개, 중국산 6개, 기타 해외산 5개 등 총 36개의 시료에서 총 4,748,564쌍의 paired-end reads를 생산, 확보할 수 있었다. 대두시료와 비교하여 참깨 자체의 gDNA에서 유래된 reads가 검출되지 않아 참깨시료의 미생물 gDNA의 ITS 메타지놈 시퀀스 reads를 확보할 수 있었다 (표 92).

표 92. 참깨의 곰팡이 ITS 메타지놈 시퀀스 생산 정보

Sample	Total Bases	Read Count	Read Pairs	GC (%)	Q20 (%)
17K-02-I	104,115,900	345,900	172,950	50.01	91.81
17K-05-I	94,118,486	312,686	156,343	51.98	90.38
17K-06-I	95,100,348	315,948	157,974	47.44	92.08
17K-07-I	96,203,814	319,614	159,807	52.52	91.28
17K-09-I	88,444,636	293,836	146,918	47.52	92.79
17K-12-I	96,598,124	320,924	160,462	52.70	90.88
17K-13-I	86,663,318	287,918	143,959	50.31	90.79
17K-14-I	109,098,052	362,452	181,226	51.04	91.47
17K-16-I	108,478,594	360,394	180,197	52.15	91.30
17K-18-I	101,619,406	337,606	168,803	49.86	91.98
17K-19-I	99,484,714	330,514	165,257	52.60	89.65
17K-20-I	111,180,972	369,372	184,686	53.05	90.93
17K-21-I	100,246,244	333,044	166,522	52.40	90.36
17K-23-I	102,716,250	341,250	170,625	51.49	89.30
17K-24-I	97,695,570	324,570	162,285	49.67	92.09
17K-28-I	75,754,476	251,676	125,838	53.69	88.82
17K-30-I	105,870,730	351,730	175,865	48.44	91.10
17K-32-I	84,312,508	280,108	140,054	60.95	87.80
17K-33-I	90,874,308	301,908	150,954	50.93	90.54
17K-35-I	100,586,374	334,174	167,087	52.08	90.42
17K-37-I	49,388,080	164,080	82,040	56.67	86.25
17K-38-I	93,630,866	311,066	155,533	49.61	91.18
17K-S1-I	95,495,862	317,262	158,631	44.95	92.51
17K-S3-I	102,293,646	339,846	169,923	50.26	92.96
17K-S6-I	127,742,594	424,394	212,197	47.48	87.99
17C-01-I	74,622,716	247,916	123,958	64.92	84.51
17C-02-I	95,773,986	318,186	159,093	60.69	88.37
17C-03-I	95,885,958	318,558	159,279	54.39	88.04
17C-04-I	102,991,966	342,166	171,083	60.37	87.71
17C-05-I	99,248,730	329,730	164,865	54.48	88.96
17C-06-I	87,625,314	291,114	145,557	59.27	87.25
Ethiopia-I	99,233,078	329,678	164,839	49.98	89.32
India-I	94,836,672	315,072	157,536	59.52	88.52
Nigeria-C-I	88,885,902	295,302	147,651	59.89	88.95
Nigeria-O-I	97,522,194	323,994	161,997	57.65	89.22
Pakistan-I	78,876,448	262,048	131,024	61.09	87.03

② 농산물 원산지 시료 별 차별화 미생물 군집 분석 및 필터링

NGS에 의해서 생성된 paired-end 형식의 염기서열자료 (reads)들을 LotuS pipeline (<http://psbweb05.psb.ugent.be/lotus/>)을 이용하여 분석하였다. 대두시료 분석에 사용했던 QIIME를 이용한 분석과정을 자동화한 것으로 세부적인 분석절차는 거의 동일하다.

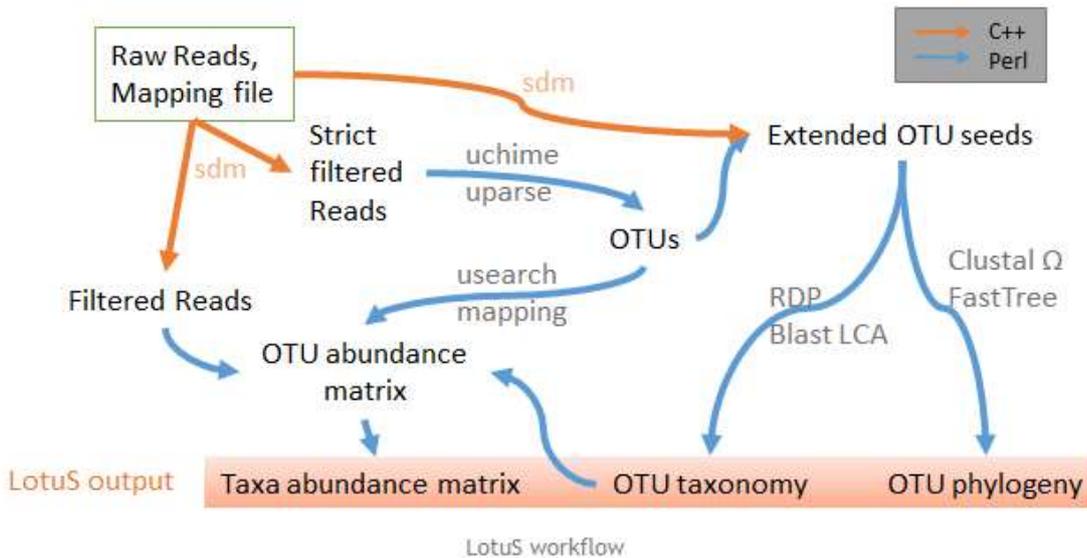


그림 145. LotuS pipeline을 이용한 메타지놈 분석 모식도

라이브러리를 모두 모아서 미생물 군집을 분석하면 특정시료에서 특별히 많이 발현되는 reads들이 필터링 되는 것이 확인되어, 각 라이브러리 별로 메타지놈 분석을 하여 각각의 OTU들을 만든 후 이들을 다시 clustering software로 클러스터링하고 분석함으로써 보다 복잡한 분석 과정이 필요하다. 2차년도와 마찬가지로 계통분석 (phylogenetic tree analysis)의 정확도를 높이기 위하여 진균과 세균의 계통분석에 사용하는 UNITE fungal ITS database와 Greengenes 16S rRNA database는 최근의 자료들이 미반영되어 있기 때문에 보다 정확한 계통분류를 위해서 NCBI의 nt database와 16S ribosomal RNA database에 BlastN 분석한 후, NCBI의 ete3 toolkit을 이용하여 계통분석을 재수행하였다.

곰팡이 ITS 군집분석에 의해 생산된 OTU들은 소수의 특정 군주에 집중되는 특성을 보이는데, 군집별로 13~200개의 OTU를 만드는데, 이중 1,000 reads를 가지는 OTU들은 10여개 이내로까지 줄어드는 특성을 보인다.

세균의 16S rRNA 군집은 곰팡이보다 라이브러리별 편차가 매우 컸는데, 1000개 이상의 reads를 가지는 OTU는 대부분의 라이브러리에서 수개의 수준으로 줄어드는 특성을 보였고, 세균이 곰팡이보다 환경에 따라 보다 군집변화가 다양하게 일어나는 경향성이 있는 것으로 해석된다. 세균의 속(genus)별 누적도수분포표는 곰팡이보다 훨씬 불규칙적인 특성을 보이는 것도 이런 현상과 관련이 있는 것으로 분석되었다.

(바) 메타지놈 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 (community) 분석

Lotus pipeline을 이용하여 분석하고, NCBI nr database와 microbial 16S RNA database 대신 NCBI에서 reference material을 이용하여 만든 16S ribosomal RNA sequence database와 fungi type ITS database를 이용하여 종동정을 하였다.

① 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석

표 93는 lotus pipeline으로 함께 16S metagenome 세균 군집 분석결과를 요약한 결과로 일부 시료에서 엽록체나 미토콘드리아에서 유래된 OTU들이 발견되긴 했지만, 최소 3만 reads 이상이 align될 정도로 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

표 93. Lotus pipeline로 분석한 함께 세균 16S metagenome 요약

Sample	Name	Raw	OTUs	TotalAlign	OTU_host	HostAlign	OTUsfilter	AlignedFit	%aligned
17K-02	K_JB1	159,386	57	113,489	2	14	55	113,475	71.20%
17K-18	K_JB2	177,283	80	123,600	-	-	80	123,600	69.72%
17K-19	K_JB3	188,108	154	148,770	13	90	141	148,680	79.04%
17K-12	K_JN1	176,272	153	143,134	2	19	151	143,115	81.19%
17K-13	K_JN2	181,422	118	154,603	6	54	112	154,549	85.19%
17K-14	K_JN3	165,821	121	111,328	2	9	119	111,319	67.13%
17K-S6	K_JN4	232,052	81	208,797	5	53	76	208,744	89.96%
17K-S1	K_GB1	176,320	75	151,783	1	4	74	151,779	86.08%
17K-S3	K_GB2	166,196	74	129,958	2	19	72	129,939	78.18%
17K-33	K_GB3	169,089	85	140,984	1	7	84	140,977	83.37%
17K-06	K_GN1	172,484	87	91,627	1	3	86	91,624	53.12%
17K-09	K_GN2	178,197	67	112,663	3	10	64	112,653	63.22%
17K-24	K_GN3	186,806	109	102,837	12	164	97	102,673	54.96%
17K-05	K_CN1	169,722	78	125,026	-	-	78	125,026	73.67%
17K-16	K_CN2	173,281	64	136,373	1	9	63	136,364	78.70%
17K-35	K_CN3	197,665	159	101,768	15	239	144	101,529	51.36%
17K-28	K_CB1	166,060	147	145,690	5	360	142	145,330	87.52%
17K-32	K_CB2	167,680	634	108,324	24	32,599	610	75,725	45.16%
17K-38	K_CB3	189,110	173	85,745	3	221	170	85,524	45.22%
17K-07	K_GG1	187,238	231	81,556	4	37	227	81,519	43.54%
17K-21	K_GG2	169,422	186	32,129	5	62	181	32,067	18.93%
17K-37	K_GG3	154,247	164	141,156	3	155	161	141,001	91.41%
17K-23	K_GW1	166,513	48	153,981	2	54	46	153,927	92.44%
17K-30	K_GW2	171,662	119	33,855	3	12	116	33,843	19.71%
17K-20	K_JJ1	181,642	185	51,257	1	473	184	50,784	27.96%
17C-01	O_C1	226,762	124	199,984	2	6,925	122	193,059	85.14%
17C-02	O_C2	171,441	48	159,761	3	214	45	159,547	93.06%
17C-03	O_C3	177,665	49	34,736	2	40	47	34,696	19.53%
17C-04	O_C4	177,951	35	156,770	1	16	34	156,754	88.09%
17C-05	O_C5	152,047	64	108,001	5	116	59	107,885	70.96%
17C-06	O_C6	202,661	166	187,592	6	2,799	160	184,793	91.18%
Ethiopia	O_A1	138,078	295	100,068	13	128	282	99,940	72.38%
Nigeria-C	O_A2	187,430	713	142,933	33	1,635	680	141,298	75.39%
Nigeria-O	O_A3	187,379	557	105,979	38	4,882	519	101,097	53.95%
India	O_I1	184,434	848	139,632	30	8,503	818	131,129	71.10%
Pakistan	O_I2	189,825	483	141,858	28	83,553	455	58,305	30.72%

OTU 개수 수준에서 간략히 비교해보면 K_CB2를 제외한 나머지 국내산은 50~200개 정도의 OTU를 보이는데, 이는 외국산 중 중국산과 비슷한 경향이다. 그리고, 아프리카나 인도, 파키스탄 지역의 시료는 국내산이나 중국산보다 2~4배 가량 많은 OTU 개수를 보이는데, 이는 이들의 기후와 연관이 있을 가능성이 크다.

16S metagenome 분석을 통해 얻은 참깨 미생물 gDNA의 세균 미생물 군집의 species 분포는 표 94와 그림 146과 같다.

표 94-1. 국내산 참깨시료들의 세균군집 species 분포 (%ratio)

	K_JB1	K_JB2	K_JB3	K_JN1	K_JN2	K_JN3	K_JN4	K_GB1	K_GB2	K_GB3	K_GN1	K_GN2	K_GN3
<i>Pantoea eucriana</i>	90.10%	70.00%	65.10%	58.70%	0.02%	65.90%	0.27%	63.40%	0.01%	42.70%	85.10%	59.00%	21.70%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.19%	0.00%	17.70%	0.47%	33.60%	0.00%	13.50%	2.00%	19.90%	22.00%	0.14%	24.60%	0.57%
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.18%	57.50%	0.00%	0.00%	0.00%	73.30%	0.00%	0.26%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	71.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus wiedmannii</i>	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.00%	0.21%	0.02%	0.00%	5.77%	0.10%	5.42%	0.80%	0.03%	0.04%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	66.80%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.00%	0.00%	0.15%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.25%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.00%	7.83%	0.58%	0.00%	0.00%	1.27%	0.00%	0.00%	2.11%	13.10%	0.27%	0.00%	0.39%
<i>Cronobacter dublinensis</i>	0.00%	0.00%	0.18%	0.44%	0.02%	2.62%	2.71%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.01%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.03%	0.00%	0.04%	0.00%	0.29%	3.99%	0.60%	0.69%	0.02%	2.06%	0.00%	0.00%	0.91%
<i>Pantoea conspicua</i>	0.00%	0.08%	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%	0.07%	1.01%	0.04%	0.00%	0.26%	8.80%	0.73%
<i>Sphingomonas roseiflava</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Novosphingobium guangzhouense</i>	0.82%	4.30%	1.15%	3.11%	0.00%	0.66%	0.12%	0.70%	0.95%	1.74%	0.04%	0.00%	0.05%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3.26%	1.49%	1.23%	0.00%	0.03%	1.56%	0.25%	0.29%	0.00%	0.27%	0.00%	1.08%	0.05%
<i>Exiguobacterium indicum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	23.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea plantarum</i>	0.00%	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	5.95%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	0.28%	0.00%	0.00%	5.13%	0.00%	0.00%	0.07%	0.17%	0.44%	1.71%	0.00%	0.00%	0.02%
<i>Bacillus qingshengii</i>	0.02%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	1.14%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%
<i>Sphingomonas endophytica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	16.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizobium populi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.20%	8.60%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.01%	0.98%	0.71%	0.00%	0.43%	0.00%	0.01%	0.00%	0.49%	2.98%	0.17%	0.00%	0.02%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0.00%	0.02%	6.00%	0.15%	0.00%	0.34%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.03%	0.00%
<i>Pseudomonas cerasi</i>	0.00%	9.36%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus circulans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.49%	0.07%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acinetobacter variabilis</i>	0.00%	0.00%	0.38%	0.00%	0.01%	1.07%	0.00%	3.23%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter tabaci</i>	0.00%	0.00%	2.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobacterium bambusae</i>	0.34%	1.00%	0.00%	0.00%	0.16%	0.18%	0.02%	0.06%	0.00%	0.06%	0.53%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0.48%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.64%	0.00%	0.37%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas flavescens</i>	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.20%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%
<i>Massilia suwonensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.24%
<i>Pantoea eucriana</i>	0.00%	0.00%	0.01%	1.23%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas entomophila</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobacterium thalophilum</i>	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

표 94-2. 국내산 참깨시료들의 세균군집 species 분포 (%ratio)

	K_CN1	K_CN2	K_CN3	K_CB1	K_CB2	K_CB3	K_GG1	K_GG2	K_GG3	K_GW1	K_GW2	K_JJ1
<i>Pantoea eucrina</i>	5.16%	53.30%	0.03%	29.30%	33.80%	0.03%	58.50%	0.17%	0.00%	61.90%	0.04%	1.02%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	9.80%	30.80%	69.50%	60.10%	37.80%	66.50%	0.07%	4.61%	0.10%	7.93%	0.02%	13.10%
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.44%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.36%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus wiedmannii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	12.50%	0.03%	0.00%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.03%	0.00%	0.00%	77.60%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	60.80%	0.34%	0.10%	0.12%	0.00%	0.04%	0.31%	0.74%	0.05%	0.17%	12.70%	0.35%
<i>Pantoea septica</i>	0.11%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3.08%	1.40%	0.00%	0.01%	0.00%	7.33%	0.00%	1.85%	14.40%	0.05%	7.02%	27.60%
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.04%	0.00%	0.00%	0.72%	3.54%	4.15%	0.00%	11.90%	0.00%	0.00%	7.34%	1.35%
<i>Cronobacter dublinensis</i>	0.21%	0.00%	0.00%	0.00%	0.32%	0.00%	0.00%	16.40%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.00%	4.02%	0.20%	0.52%	0.03%	0.01%	0.04%	2.40%	0.03%	0.33%	0.37%	0.02%
<i>Pantoea conspicua</i>	0.00%	0.04%	7.90%	3.51%	0.01%	0.00%	1.29%	0.00%	0.00%	0.64%	0.16%	0.43%
<i>Sphingomonas roseiflava</i>	0.00%	0.00%	3.72%	2.28%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Novosphingobium guangzhouense</i>	1.73%	0.06%	0.09%	0.00%	0.15%	5.05%	14.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.68%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0.28%	0.00%	0.28%	0.40%	0.36%	1.49%	1.71%	4.16%	0.01%	0.14%	5.41%	0.00%
<i>Exiguobacterium indicum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea plantarum</i>	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	13.90%	0.00%	0.00%
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.61%	0.18%	0.00%	0.00%	0.00%	45.80%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	0.00%	0.00%	0.53%	0.00%	0.78%	0.00%	0.28%	0.00%	0.00%	0.01%	28.60%	0.00%
<i>Bacillus qingshengii</i>	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.22%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingomonas endophytica</i>	0.00%	1.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizobium populi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.00%	0.21%	1.08%	0.00%	0.00%	0.00%	2.26%	1.92%	0.06%	0.00%	3.50%	0.00%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.58%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0.60%	0.49%	0.34%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	1.27%	0.00%	0.62%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas cerasi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.35%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus circulans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.21%	0.00%	0.00%
<i>Acinetobacter variabilis</i>	0.27%	0.00%	0.00%	0.01%	0.06%	0.02%	0.00%	0.66%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter tabaci</i>	0.00%	0.00%	3.32%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobacterium bambusae</i>	0.06%	0.03%	0.23%	0.00%	0.15%	0.00%	0.00%	2.95%	0.00%	0.00%	4.74%	0.20%
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0.00%	0.00%	0.36%	0.02%	0.00%	0.06%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	5.24%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%
<i>Massilia suwonensis</i>	0.00%	0.00%	0.43%	0.00%	1.04%	0.00%	0.00%	2.88%	0.00%	0.00%	6.16%	0.00%
<i>Pantoea eucrina</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.10%	6.84%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas entomophila</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.32%	0.00%
<i>Sphingobacterium thalophilum</i>	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

표 94-3. 외국산 참깨시료들의 세균군집 species 분포 (%ratio)

	O_C1	O_C2	O_C3	O_C4	O_C5	O_C6	O_A1	O_A2	O_A3	O_I1	O_I2
<i>Pantoea eucrino</i>	0.03%	13.00%	0.01%	33.40%	43.40%	0.70%	52.50%	46.20%	64.70%	44.90%	4.25%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.18%	13.50%	60.40%	43.50%	44.70%	3.86%	31.60%	26.40%	0.01%	17.60%	6.00%
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	66.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus wiedmannii</i>	49.80%	0.02%	0.00%	0.00%	0.05%	0.06%	0.00%	0.09%	0.05%	0.12%	0.04%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.01%	0.02%	0.00%	0.03%	0.19%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	68.60%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.14%	0.00%	0.00%	0.30%	0.52%	0.91%	0.37%	0.03%	0.09%	0.43%	0.05%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.02%	0.02%	0.03%
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.16%	0.00%	0.00%	0.41%	0.33%	1.09%	0.25%	0.00%
<i>Cronobacter dublinensis</i>	0.00%	3.07%	0.00%	15.00%	0.00%	0.01%	1.18%	2.56%	0.00%	0.16%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.00%	0.00%	3.31%	7.03%	1.67%	0.08%	0.00%	0.19%	0.96%	7.22%	0.00%
<i>Pantoea conspicua</i>	0.00%	0.00%	33.00%	0.00%	1.52%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingomonas roseiflava</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	9.66%	0.00%	5.94%	0.00%	5.90%	0.00%
<i>Novosphingobium guangzhouense</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	1.59%	0.24%	0.00%	0.22%	0.24%	0.00%	0.00%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0.01%	0.00%	0.06%	0.00%	4.61%	0.30%	3.57%	0.12%	5.68%	0.56%	0.29%
<i>Exiguobacterium indicum</i>	17.80%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.02%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea plantarum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.47%	0.75%	0.77%	0.00%	0.06%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.95%	0.00%
<i>Bacillus qingshengii</i>	9.41%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.43%	0.00%	0.11%	0.01%	0.07%	0.03%
<i>Sphingomonas endophytica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	31.50%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizobium populi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	30.70%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus subtilis</i>	1.42%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%	5.38%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%
<i>Pseudomonas cerasi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.48%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%
<i>Bacillus circulans</i>	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.86%	0.99%	0.00%	0.00%	1.25%	0.63%
<i>Acinetobacter variabilis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.09%	0.00%
<i>Enterobacter tabaci</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobacterium bambusae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.57%	0.17%	0.00%
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas flavescens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.14%	1.04%	0.00%
<i>Massilia suwonensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.14%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea eucrino</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pseudomonas entomophila</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.01%
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	0.00%	0.00%	1.19%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.01%	0.00%

대체로 *Pantoea eucrino*와 *Pseudomonas oryzihabitans* 주로 분포하는 시료들이 많긴 하지만, *Pantoea wallisii*, *Pantoea dispersa*, *Bacillus wiedmannii*, *Staphylococcus gallinarum*, *Pantoea septica*, *Enterobacter cloacae* 등이 주로 분포하는 시료도 있고, 국내산과 외국산의 차이보다 시료들 간의 차이가 더 큰 것으로 보인다.

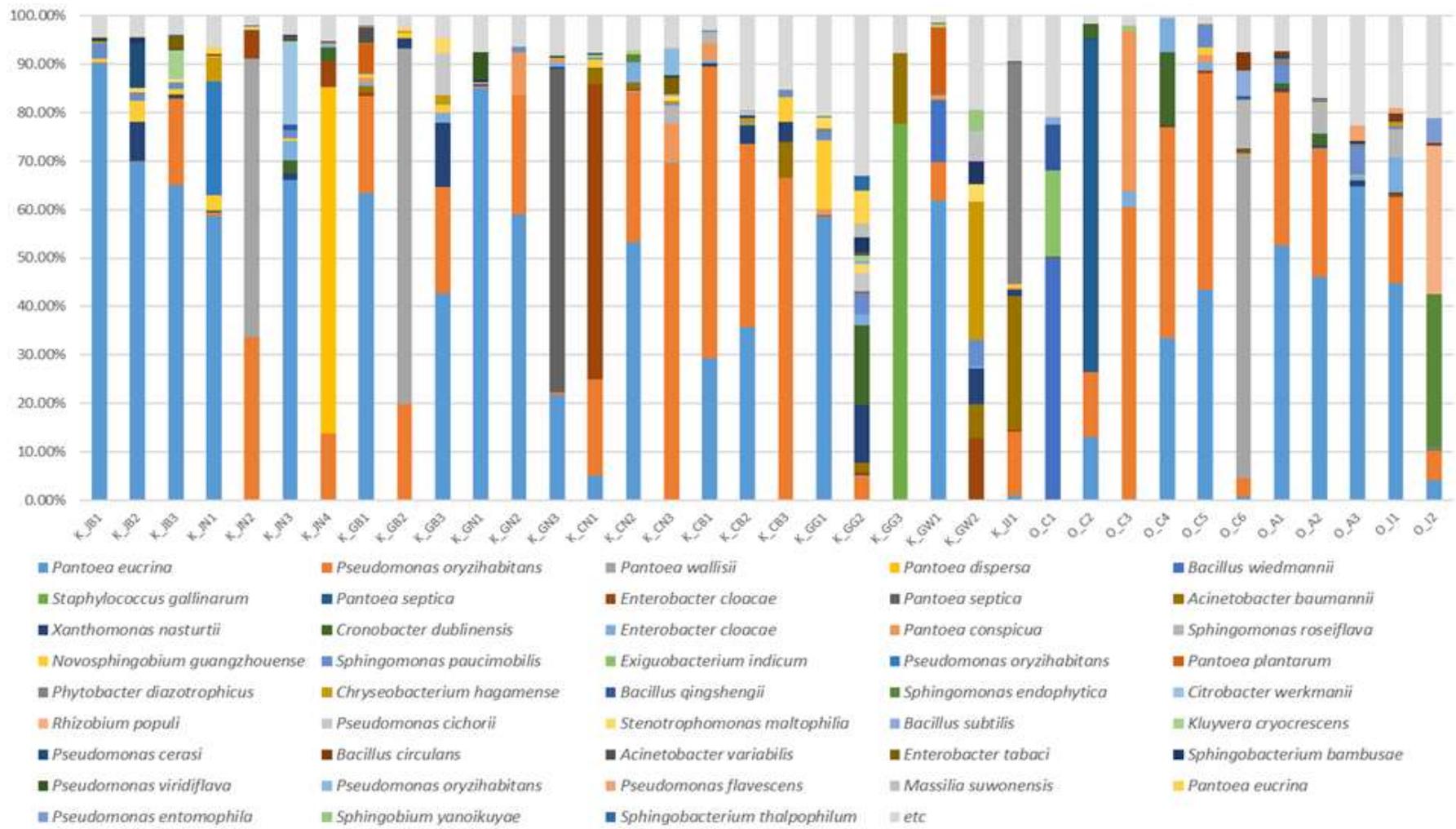


그림 146. 참깨 세균 군집내의 species 분포 (%ratio)

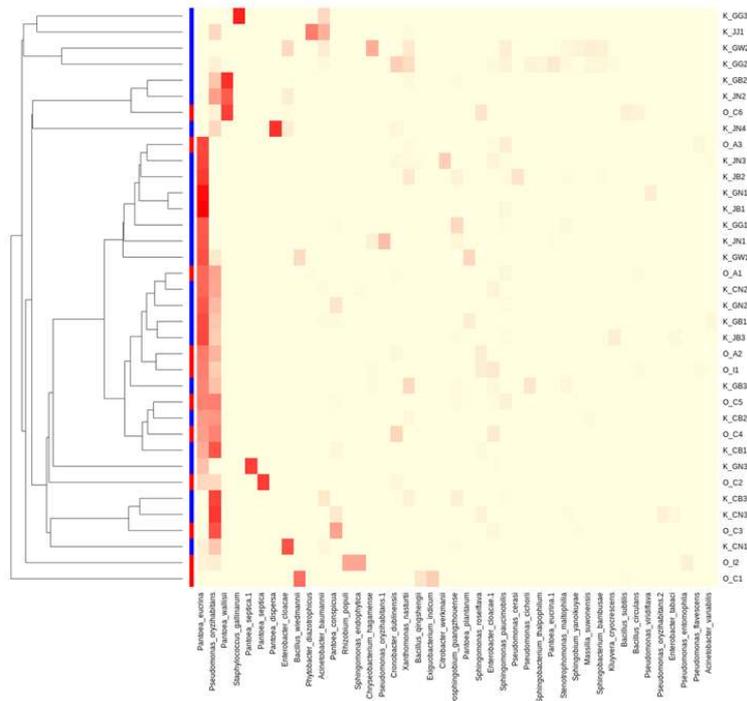


그림 147. 참깨 세균 군집의 종 (species) 수준에서의 heatmap 분석.

그림 147는 세균 군집을 heatmap으로 대부분의 *P. eucrinoa*와 *P. oryzihabitans*가 주로 분포하지만, 시료마다 비율이 다른 경우가 많고, 또 다른 균주들이 우점을 점한 시료들도 보이므로, 종 (species) 수준에서의 비교로 국내산과 외국산의 차이를 구별하기 어려우므로, 속 (genus) 수준의 분석을 하였다.

표 95-1. 국내산 참깨시료들의 세균군집 genus 분포 (%ratio)

	K_JB1	K_JB2	K_JB3	K_JN1	K_JN2	K_JN3	K_JN4	K_GB1	K_GB2	K_GB3	K_GN1	K_GN2	K_GN3
<i>Pantoea</i>	90.40%	70.30%	65.40%	60.40%	57.70%	66.30%	72.00%	70.40%	74.20%	42.70%	85.90%	68.50%	89.50%
<i>Pseudomonas</i>	0.67%	9.55%	17.70%	23.90%	33.60%	0.00%	13.50%	20.20%	20.10%	30.60%	8.06%	24.60%	0.94%
<i>Bacillus</i>	0.02%	0.02%	0.07%	0.78%	0.07%	1.31%	0.04%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	0.02%	0.08%
<i>Enterobacter</i>	0.03%	0.21%	2.72%	0.12%	6.06%	4.10%	6.02%	1.48%	0.05%	2.12%	0.19%	0.00%	0.95%
<i>Staphylococcus</i>	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%
<i>Sphingomonas</i>	3.47%	1.49%	1.23%	0.08%	0.03%	1.65%	0.25%	0.29%	0.09%	0.27%	0.00%	1.08%	2.37%
<i>Acinetobacter</i>	0.07%	0.01%	0.57%	0.01%	0.04%	1.23%	0.00%	4.50%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.14%
<i>Cronobacter</i>	0.00%	0.02%	0.19%	0.44%	0.02%	2.62%	2.71%	0.00%	0.00%	0.53%	0.20%	0.02%	0.01%
<i>Xanthomonas</i>	0.00%	7.83%	0.58%	0.00%	0.00%	1.27%	0.00%	0.00%	2.11%	13.10%	0.27%	0.00%	0.39%
<i>Novosphingobium</i>	0.82%	4.30%	1.15%	3.11%	0.00%	0.66%	0.12%	0.70%	0.95%	1.74%	0.04%	0.00%	0.05%
<i>Chryseobacterium</i>	0.35%	0.12%	0.11%	6.53%	0.45%	0.65%	0.08%	0.17%	0.46%	2.60%	0.12%	2.69%	0.02%
<i>Exiguobacterium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Rhizobium</i>	1.01%	1.83%	0.62%	0.47%	0.01%	0.57%	0.19%	0.28%	0.00%	0.49%	0.45%	0.50%	1.96%
<i>Sphingobacterium</i>	0.63%	2.34%	1.59%	0.41%	0.25%	0.47%	0.02%	0.31%	0.29%	1.33%	2.39%	0.20%	0.06%
<i>Phytobacter</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Massilia</i>	1.57%	0.02%	0.01%	1.78%	0.84%	0.16%	0.00%	0.02%	0.02%	0.00%	0.12%	0.06%	0.47%
<i>Citrobacter</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	6.90%	2.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.01%	1.06%	0.76%	0.18%	0.45%	0.00%	0.01%	0.61%	0.49%	3.03%	0.64%	0.00%	0.05%
<i>Kluyvera</i>	0.00%	0.02%	6.00%	0.25%	0.00%	0.34%	0.05%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.03%	0.00%
<i>Klebsiella</i>	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.60%	0.00%	0.00%	0.01%	0.09%
<i>Sphingobium</i>	0.00%	0.01%	0.31%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.16%	0.00%	0.02%	0.00%

표 95-2. 국내산 참깨시료들의 세균군집 genus 분포 (%ratio)

	K_CN1	K_CN2	K_CN3	K_CB1	K_CB2	K_CB3	K_GG1	K_GG2	K_GG3	K_GW1	K_GW2	K_JJ1
<i>Pantoea</i>	5.57%	54.20%	9.65%	33.00%	36.00%	0.50%	60.10%	8.68%	0.08%	76.60%	0.47%	2.22%
<i>Pseudomonas</i>	19.80%	30.80%	75.20%	60.10%	38.60%	66.60%	1.30%	8.61%	0.10%	7.93%	1.46%	13.30%
<i>Bacillus</i>	0.03%	0.00%	0.07%	0.01%	0.37%	0.15%	0.01%	0.94%	0.04%	12.80%	0.03%	0.08%
<i>Enterobacter</i>	61.20%	4.36%	3.62%	0.64%	0.03%	0.05%	0.35%	3.14%	0.08%	0.51%	13.10%	0.36%
<i>Staphylococcus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.03%	0.00%	0.26%	79.40%	0.00%	0.03%	0.01%
<i>Sphingomonas</i>	0.28%	1.70%	4.02%	2.69%	0.43%	1.49%	1.72%	4.16%	0.08%	0.14%	5.74%	0.48%
<i>Acinetobacter</i>	3.83%	5.27%	0.06%	0.02%	0.15%	7.41%	0.05%	2.80%	14.40%	0.92%	7.02%	27.70%
<i>Cronobacter</i>	0.21%	2.55%	0.00%	0.00%	0.32%	0.00%	2.68%	16.80%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Xanthomonas</i>	0.04%	0.00%	0.00%	0.72%	3.54%	4.15%	0.00%	11.90%	0.00%	0.00%	7.34%	1.35%
<i>Novosphingobium</i>	1.73%	0.06%	0.09%	0.00%	0.15%	5.05%	14.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.68%
<i>Chryseobacterium</i>	0.00%	0.02%	0.58%	0.11%	0.78%	3.33%	2.07%	3.07%	0.00%	0.01%	30.80%	0.09%
<i>Exiguobacterium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizobium</i>	0.22%	0.00%	0.86%	0.71%	0.07%	0.04%	0.00%	2.37%	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%
<i>Sphingobacterium</i>	1.83%	0.05%	0.35%	0.07%	0.21%	5.34%	2.51%	10.70%	0.05%	0.00%	10.70%	0.63%
<i>Phytobacter</i>	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.61%	0.18%	0.00%	0.00%	0.00%	45.80%
<i>Massilia</i>	0.73%	0.05%	1.31%	0.08%	2.03%	1.13%	1.92%	8.86%	0.26%	0.05%	7.65%	0.13%
<i>Citrobacter</i>	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.17%	0.00%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.00%	0.21%	1.24%	0.44%	0.00%	0.21%	2.49%	3.02%	0.09%	0.00%	4.72%	0.64%
<i>Kluyvera</i>	0.60%	0.49%	0.34%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	1.30%	0.00%	0.62%	0.00%	0.02%
<i>Klebsiella</i>	3.34%	0.00%	0.45%	0.00%	0.07%	0.02%	0.25%	0.52%	0.02%	0.00%	0.06%	0.01%
<i>Sphingobium</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.32%	0.00%

표 95-3. 외국산 참깨시료들의 세균군집 genus 분포 (%ratio)

	O_C1	O_C2	O_C3	O_C4	O_C5	O_C6	O_A1	O_A2	O_A3	O_I1	O_I2
<i>Pantoea</i>	0.03%	81.70%	33.40%	33.60%	45.10%	67.60%	52.70%	46.80%	64.70%	46.80%	4.26%
<i>Pseudomonas</i>	0.84%	13.50%	60.50%	43.50%	44.70%	4.13%	32.60%	26.50%	3.54%	18.70%	11.10%
<i>Bacillus</i>	62.90%	0.10%	0.06%	0.00%	0.06%	10.70%	1.64%	3.14%	1.17%	1.90%	1.15%
<i>Enterobacter</i>	0.14%	0.00%	3.32%	7.33%	2.19%	0.99%	0.37%	0.22%	1.05%	7.65%	0.05%
<i>Staphylococcus</i>	0.37%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.06%	0.03%	0.00%	0.03%	0.47%
<i>Sphingomonas</i>	0.23%	0.00%	0.06%	0.01%	4.87%	9.97%	4.01%	6.06%	6.24%	7.23%	32.10%
<i>Acinetobacter</i>	0.86%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.07%	0.01%	0.08%	0.02%	0.17%	0.05%
<i>Cronobacter</i>	0.00%	4.20%	0.34%	15.00%	0.00%	0.01%	1.48%	2.57%	0.00%	0.16%	0.00%
<i>Xanthomonas</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.16%	0.00%	0.00%	0.41%	0.33%	1.09%	0.25%	0.00%
<i>Novosphingobium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	1.59%	0.24%	0.00%	0.22%	0.24%	0.00%	0.00%
<i>Chryseobacterium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.16%	0.09%	0.23%	0.03%	0.02%	0.97%	0.01%
<i>Exiguobacterium</i>	17.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%	0.02%
<i>Rhizobium</i>	0.00%	0.03%	0.17%	0.00%	0.12%	0.13%	0.18%	0.44%	0.00%	0.00%	30.70%
<i>Sphingobacterium</i>	0.00%	0.01%	0.18%	0.01%	0.06%	0.00%	0.19%	0.34%	0.86%	0.46%	0.53%
<i>Phytobacter</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.47%	0.75%	0.77%	0.00%	0.06%
<i>Massilia</i>	1.94%	0.00%	0.00%	0.15%	0.81%	0.05%	0.20%	0.23%	0.46%	0.55%	0.11%
<i>Citrobacter</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.30%	0.05%	0.02%
<i>Kluyvera</i>	0.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%
<i>Klebsiella</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.03%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.09%	0.02%
<i>Sphingobium</i>	0.00%	0.00%	1.19%	0.01%	0.00%	0.00%	0.21%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%

표 95, 그림 148, 149는 국내산과 국외산 참깨 시료들에서 얻어진 세균 군집을 속 (genus) 수준에서 비교 분석한 것으로 종 (species) 수준에서 비교 분석한 결과보다 단순화되었지만, 역시 국내산과 외국산의 차이보다는 시료간의 차이가 더 많음을 알 수 있다.

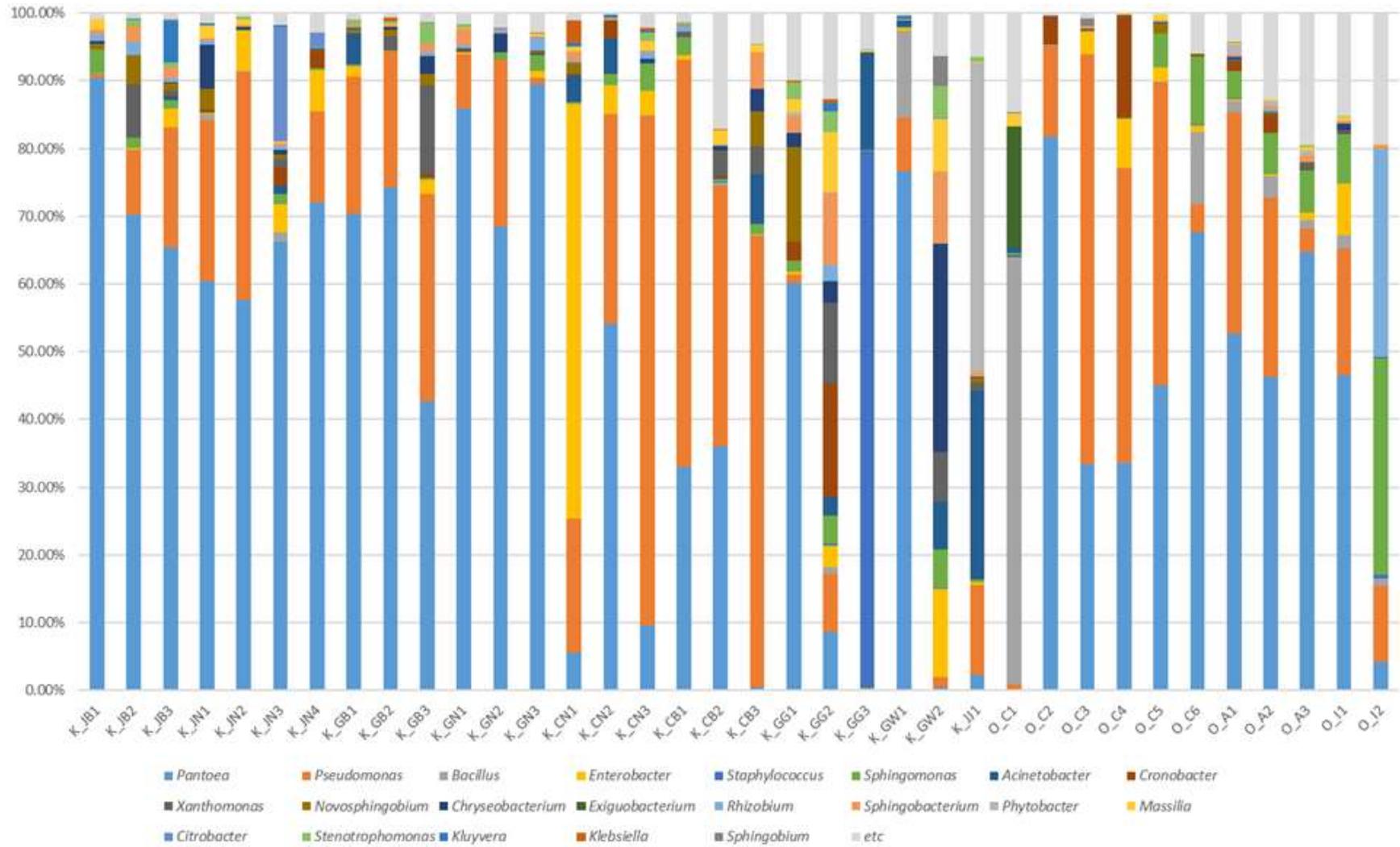


그림 148. 참깨 세균 군집내의 genus 분포 (%ratio)

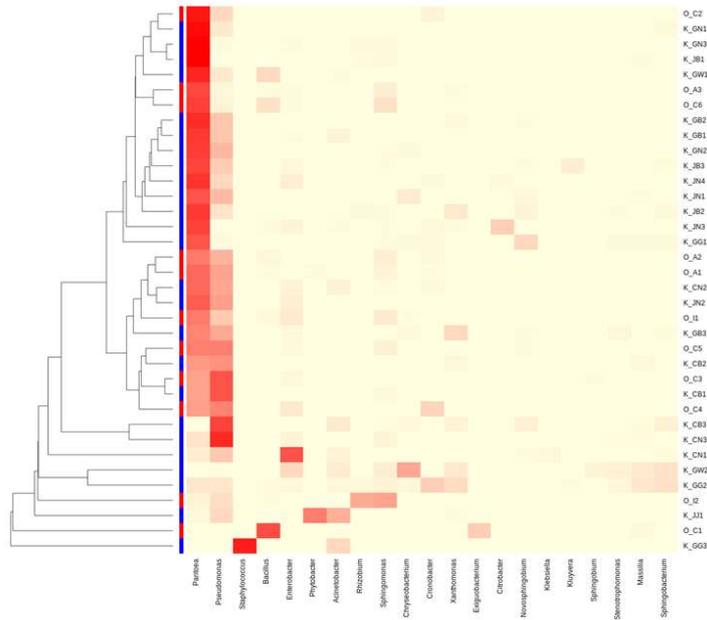


그림 149. 참깨 세균 군집의 속 (genus) 수준에서의 heatmap 분석.

미국 USDA 사이트의 metagenome 분석툴인 Metagenomics Core Microbiom Exploration Tool (MetaCoMET)을 이용하여 각 그룹간의 비교 분석을 체계화 하였다.

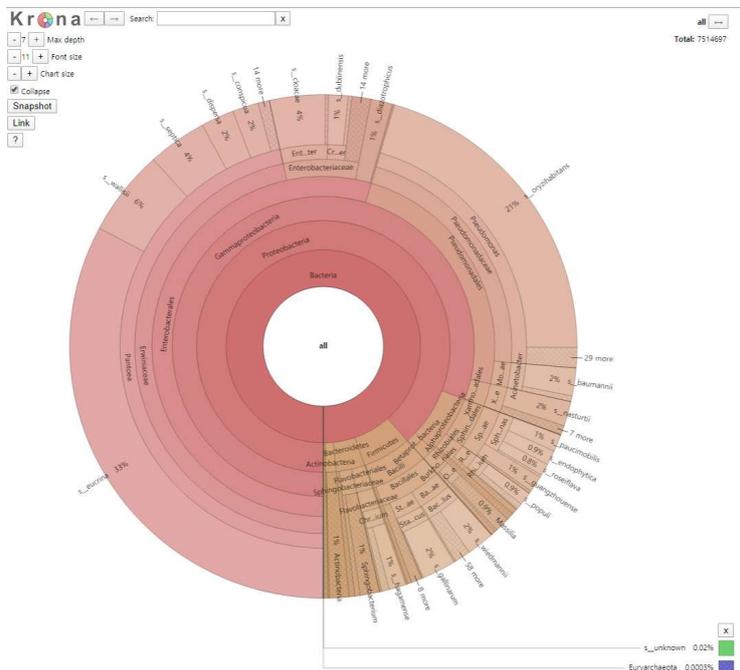


그림 150. 참깨 세균군집의 계통분류학 수준의 relative abundance chart

Metagenome 분석을 통해 얻어진 세균군집의 OTU들이 속한 종들을 MetaCoMET을 이용하여 계통분류학 수준에서 상대적인 비율분포 (그림 150)를 보면, *Pantoea* 속 세균이 절반에 가까운 비율 (그중 *P. eucrina*가 33%)을 보이고, *Pseudomonas* 속이 1/4에 가까운 비율 (그중 *P. oryzihabitans*가 21%)을 보이는 등 과점현상을 보임을 알 수 있다.

그림 151와 그림 152은 MetaCoMET을 이용하여 얻은 밴다이어그램들과 alpha diversity 차트들인데, 국내산과 외국산으로 비교하는 것보다, 국내산, 중국산, 아프리카인도산으로 분류해서 비교하는게 더 차이를 쉽게 나타내는 것임을 알 수 있다. 특히, 그림 150D에서 보듯이, 1%이상 풍부하게 발현되는 종 (OTU)들간의 비교에서 중국산은 국내산에 종속되고 1%이하로 적게 발현되는 종 (OTU)들의 개수도 국내산이나 아프리카인도산보다 훨씬 적은데, 이는 그만큼 국내산과 중국산의 다양성 차이가 없음을 나타낸다.

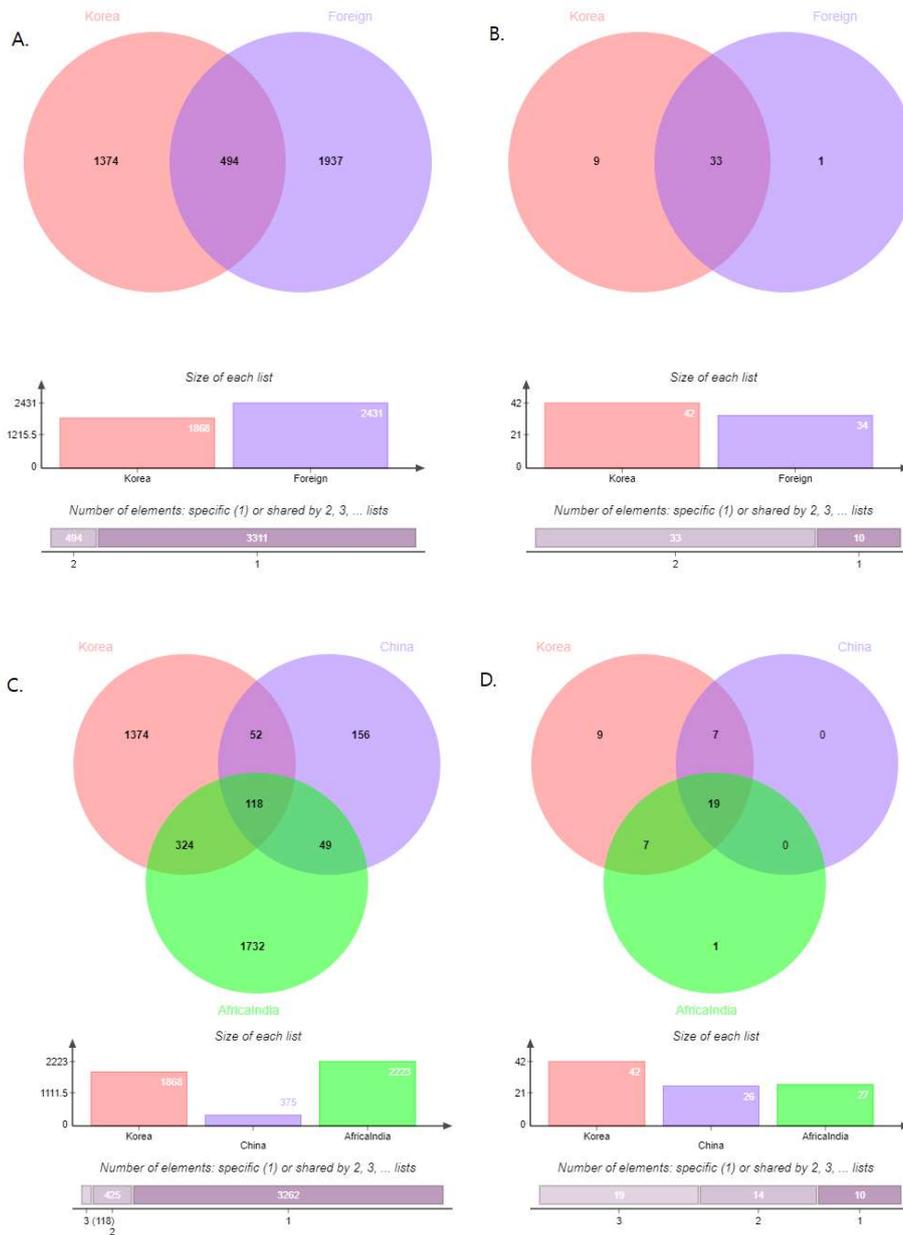


그림 151. 참깨 세균군집의 Venn diagram

- 1) A, B는 국내산과 국외산으로 C, D는 국내산, 중국산, 아프리카인도로 나눠 비교
- 2) A, C는 모든 OTU들을 비교, B, D는 하나 이상의 시료에서 1% 이상 발현된 OTU들만 선 발해서 비교한 것임

이러한 것은 그림 152의 alpha diversity 분석에서 확실히 보여주는데, 종에 대한 richness를 나타내는 chao1 index와 종의 다양성을 추정한 shannon index 분포에서 아프리카인도산이 국내산이나 중국산보다 크게 나타난다. 하지만, 하나 이상의 시료에서 1% 이상 풍부하게 나타나는 종 (OTU)들만 비교했을 때 아프리카인도산 특이적인 종이 1개밖에 없는 것은 아프리카인도산 특이적인 종들이 그만큼 희귀하게 발견된다는 것을 의미한다.

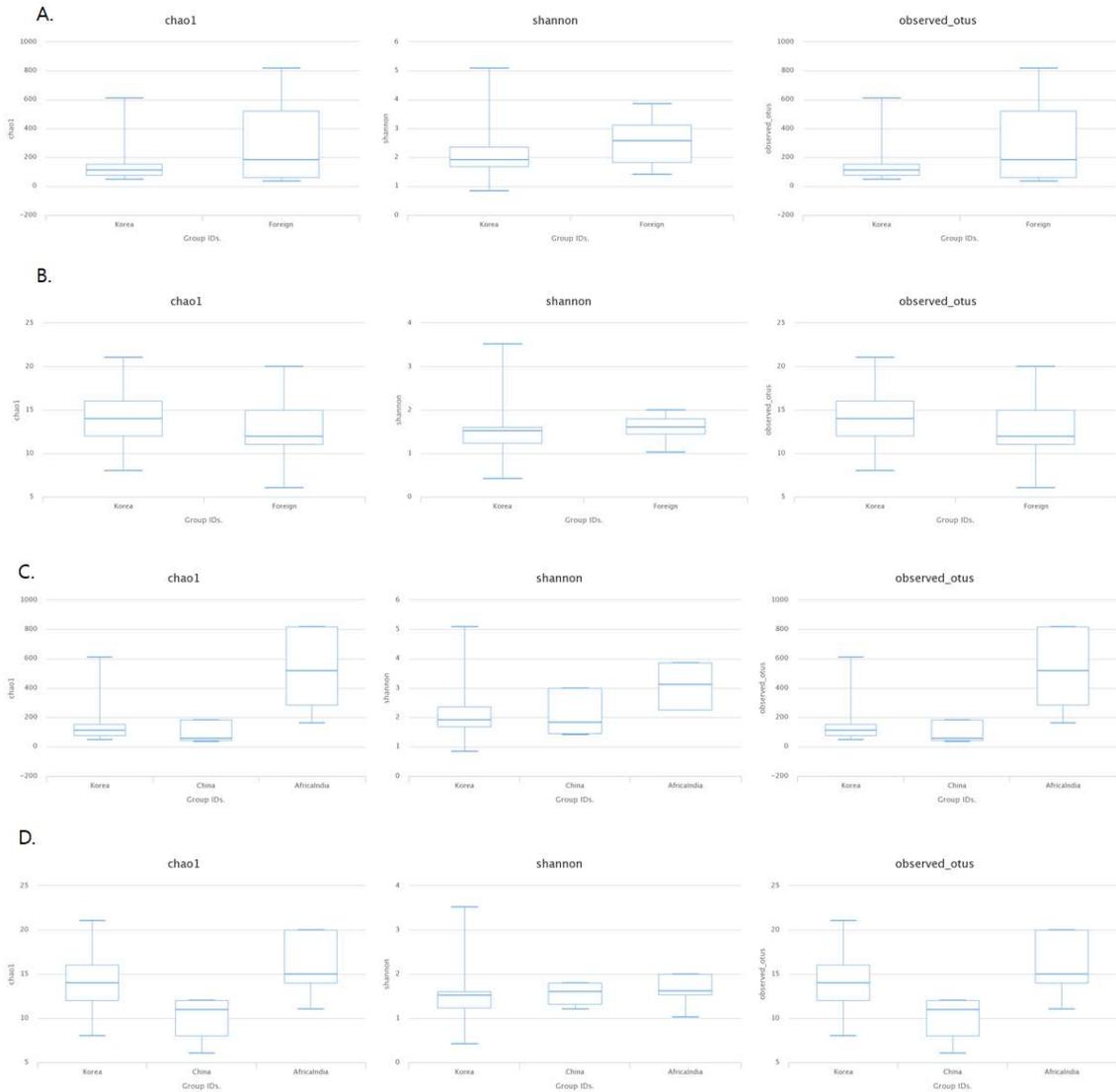


그림 152. 참깨 세균군집의 alpha diversity 분석

- 1) A, B는 국내산과 국외산으로 C, D는 국내산, 중국산, 아프리카인도로 나눠 비교
- 2) A, C는 모든 OTU들을 비교, B, D는 하나 이상의 시료에서 1% 이상 발현된 OTU들만 선 발해서 비교한 것임

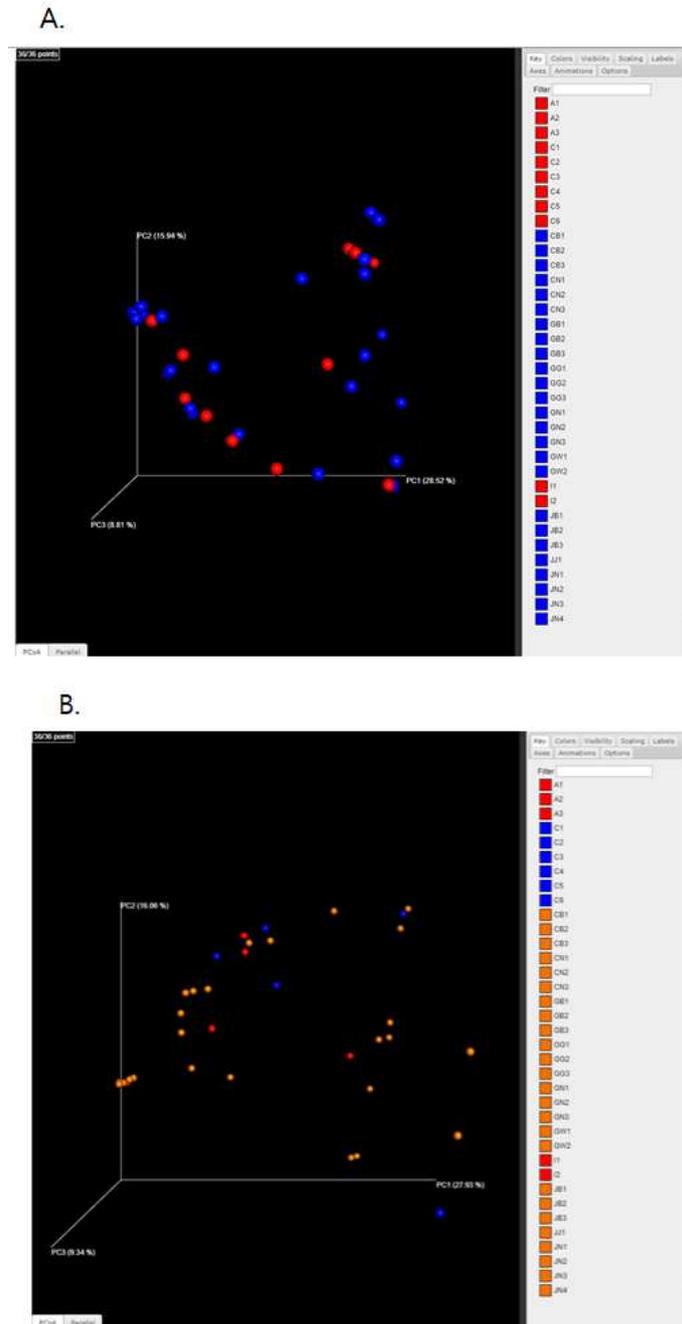


그림 153. 참깨 세균 균집들의 Principal coordinate analysis (PCoA) plot
 (A) 국내산과 중국산 그룹으로 분류,
 (B) 국내산, 중국산 및 아프리카인도산 그룹으로 분류

국내산과 외국산들의 유사도를 볼수 있는 주좌표분석 (Principal coordinate analysis, PCoA)에서도 각시료들이 그룹별로 묶이는 경향이 없었는데 (그림 153), 이는 국내산과 외국산들을 세균 균집비교로 구분하기 어려움을 나타낸다.

② 진균 ITS 미생물 군집 분석

표 96은 참깨 ITS metagenome 진균 군집 분석결과를 요약한 결과인데, 참깨 또는 식물의 ITS와 매치되는 OTU는 발견하지 못했지만, O_C1처럼 align된 reads수가 매우 적은 시료가 나오기도 했다. 하지만 align된 reads수가 10만이 넘거나 가까운 것들이 대부분이라 서로 비교분석하기에 충분했다. 아프리카인도산의 OTU 수가 국내산이나 중국산보다 2배이상 훨씬 많았던 세균 군집 (최대 848개)과 달리, 국내산이나 중국산, 아프리카인도산 모두 최대 200개를 넘지않고 각각 13개와 15개의 매우 적은 OTU를 가진 K_GG3와 O_C1도 있었다. Align된 reads수가 4,422개에 불과한 O_C1은 동일한 수준에서 다른 시료들과 비교하기 무리가 있지만, K_GG3는 66,858개의 비교적 많은 reads가 align되었음에도 불구하고 13개의 매우 적은 OTU를 가지는 것은 그만큼 다양성이 적은 군집을 이루고 있다는 것을 의미한다. 또한, align된 reads수가 극단적으로 적은 O_C1의 경우 16S는 19.3만개나 되는 reads로 85%의 매우 높은 %align을 보이는 것으로 보아, 이 시료는 세균군집이 우세하게 형성되어 있었다.

표 96. Lotus pipeline로 분석한 참깨 진균 ITS metagenome 요약

Sample	Name	Raw	OTUs	Aligned	%aligned
17K-02	K_JB1	172,950	93	150,633	87.10%
17K-18	K_JB2	168,803	92	152,779	90.51%
17K-19	K_JB3	165,257	142	134,754	81.54%
17K-12	K_JN1	160,462	138	140,184	87.36%
17K-13	K_JN2	143,959	161	109,176	75.84%
17K-14	K_JN3	181,226	171	160,318	88.46%
17K-S6	K_JN4	212,197	101	162,281	76.48%
17K-S1	K_GB1	158,631	120	99,715	62.86%
17K-S3	K_GB2	169,923	120	154,469	90.91%
17K-33	K_GB3	150,954	49	119,585	79.22%
17K-06	K_GN1	157,974	66	143,798	91.03%
17K-09	K_GN2	146,918	140	62,579	42.59%
17K-24	K_GN3	162,285	135	124,684	76.83%
17K-05	K_CN1	156,343	83	128,120	81.95%
17K-16	K_CN2	180,197	80	155,226	86.14%
17K-35	K_CN3	167,087	147	124,556	74.55%
17K-28	K_CB1	125,838	161	87,365	69.43%
17K-32	K_CB2	140,054	109	31,824	22.72%
17K-38	K_CB3	155,533	146	109,153	70.18%
17K-07	K_GG1	159,807	200	104,412	65.34%
17K-21	K_GG2	166,522	187	106,441	63.92%
17K-37	K_GG3	82,040	13	66,858	81.49%
17K-23	K_GW1	170,625	59	88,940	52.13%
17K-30	K_GW2	175,865	137	90,180	51.28%
17K-20	K_JJ1	184,686	115	98,201	53.17%
17C-01	O_C1	123,958	15	4,422	3.57%
17C-02	O_C2	159,093	116	73,343	46.10%
17C-03	O_C3	159,279	75	125,458	78.77%
17C-04	O_C4	171,083	142	66,825	39.06%
17C-05	O_C5	164,865	105	135,417	82.14%
17C-06	O_C6	145,557	95	87,955	60.43%
Ethiopia	O_A1	164,839	152	57,409	34.83%
Nigeria-C	O_A2	147,651	168	52,769	35.74%
Nigeria-O	O_A3	161,997	137	71,039	43.85%
India	O_I1	157,536	139	77,225	49.02%
Pakistan	O_I2	131,024	66	39,980	30.51%

ITS metagenome 분석을 통해 얻은 참깨 종자에서 검출된 진균 군집내의 종 (species) 분포는 표 97와 그림 154과 같다.

표 97-1. 국내산 참깨시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	JB1	JB2	JB3	JN1	JN2	JN3	JN4	GB1	GB2	GB3	GN1	GN2	GN3
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	79.40%	0.00%	29.50%	38.90%	22.40%	44.80%	0.00%	56.20%	0.00%	62.40%	0.00%	0.00%	50.30%
<i>Alternaria simsimi</i>	0.01%	80.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	45.90%	0.02%	83.10%	0.00%	16.80%	0.00%	0.00%
<i>Corynespora torulosa</i>	2.60%	1.27%	9.14%	5.21%	26.70%	7.05%	2.92%	3.98%	3.12%	1.67%	0.17%	1.50%	0.08%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	4.66%	0.00%	1.67%	29.90%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0.00%	0.94%	10.20%	14.20%	21.70%	17.50%	3.61%	0.00%	3.08%	0.00%	0.03%	10.50%	10.10%
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	0.00%	3.76%	13.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.06%	0.00%
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.15%	0.00%	0.29%	0.70%	0.00%	0.00%	0.26%	0.07%	0.02%	1.28%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Filobasidium magnum</i>	0.76%	0.12%	0.64%	0.85%	0.17%	1.74%	0.04%	0.02%	0.15%	0.09%	35.60%	50.70%	10.60%
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.62%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Plectosphaerellaceae</i>	2.79%	1.39%	4.30%	0.00%	0.86%	12.10%	0.00%	1.61%	2.75%	18.60%	2.17%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus appendiculatus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	14.50%	4.51%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Moesziomyces rugulosus</i>	1.17%	0.01%	2.09%	2.97%	10.80%	4.20%	0.19%	1.33%	0.25%	0.24%	0.01%	5.73%	0.85%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.13%	15.60%	9.11%	0.00%	0.33%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.48%	0.00%	7.15%	0.04%	0.00%	0.00%	0.48%	1.69%	1.53%	0.48%	0.00%	4.23%	0.00%
unclassified <i>Eurotiomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis vinaria</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	26.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus sydowii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.11%	0.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
unclassified <i>Capnodiales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Wallemia mellicola</i>	0.01%	0.02%	0.00%	0.02%	1.26%	0.02%	2.71%	8.80%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium oxalicum</i>	1.99%	2.77%	2.84%	2.08%	1.81%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.80%	0.14%	0.00%	0.00%
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Naganishia albidosimilis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bullera alba</i>	0.52%	0.04%	0.25%	0.19%	0.44%	2.63%	0.03%	0.02%	0.71%	0.38%	4.18%	0.28%	0.25%
unclassified <i>Mucoromycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	14.50%
<i>Didymellaceae sp. 2 NV-2016</i>	0.00%	0.00%	0.55%	0.00%	0.00%	1.49%	0.00%	0.00%	0.00%	0.77%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium fujikuroi</i>	3.27%	0.57%	0.47%	0.30%	0.25%	0.44%	0.09%	0.48%	0.15%	0.25%	0.00%	2.02%	1.68%
<i>Rhizopus unclassified Rhizopus</i>	0.00%	0.00%	0.18%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.63%	0.00%	0.00%	0.00%	5.41%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium foetens</i>	0.00%	1.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum viticis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Dioszegia catarinonii</i>	0.00%	0.00%	1.67%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%	0.00%	4.55%	0.03%	0.04%
<i>Wallemia tropicalis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium coryli</i>	0.08%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.25%	0.14%	6.99%	0.00%	0.29%	0.00%
unclassified <i>Pleosporales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Ectophoma multirostrata</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.99%	0.81%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium halotolerans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor unclassified Mucor</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor circinelloides</i>	0.00%	3.89%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.18%	0.00%	0.27%	0.00%
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.43%
<i>Acrophialophora fusispora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizopus azygosporus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.46%	0.00%
<i>Neocosmospora rubicola</i>	0.00%	0.60%	0.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chaetomiaceae sp. AN-2017</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.87%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Naganishia albida</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.06%
unclassified <i>Lichtheimiaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	0.02%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.17%	0.00%	0.02%	0.00%
<i>Aspergillus terreus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

표 97-2. 국내산 참깨시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	CN1	CN2	CN3	CB1	CB2	CB3	GG1	GG2	GG3	GW1	GW2	JJ1
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	30.70%	48.60%	24.90%	60.20%	0.00%	41.40%	36.80%	34.10%	0.02%	16.50%	36.20%	66.90%
<i>Alternaria simsimi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	18.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Corynespora torulosa</i>	28.80%	32.80%	0.01%	3.13%	0.00%	16.30%	0.02%	11.30%	0.01%	4.38%	0.02%	7.83%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.00%	48.10%	9.58%	0.00%	10.80%	10.50%	16.90%	0.00%	0.00%	8.60%	0.00%
<i>Cladosporium oxysporum</i>	11.10%	10.00%	0.00%	0.00%	10.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.08%	0.37%	1.70%	0.00%	48.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Filobasidium magnum</i>	0.67%	0.64%	0.64%	0.62%	0.11%	0.03%	0.05%	0.50%	0.00%	0.17%	0.05%	0.66%
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	6.10%	0.00%	13.50%	0.00%	61.50%	23.60%	0.00%
unclassified <i>Plectosphaerellaceae</i>	1.93%	0.28%	0.87%	2.05%	0.15%	2.90%	17.60%	2.68%	0.00%	0.66%	1.30%	0.00%
<i>Aspergillus appendiculatus</i>	0.00%	0.00%	1.91%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.14%	0.69%	0.00%	11.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Moesziomyces rugulosus</i>	0.51%	1.81%	4.64%	0.99%	0.00%	1.86%	5.07%	1.48%	0.00%	0.00%	2.49%	12.40%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.07%	0.14%	0.00%	0.00%	0.24%	0.00%	0.00%	0.33%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	1.49%	1.47%	2.97%	0.00%	2.54%	1.84%	12.80%	0.00%	0.00%	0.83%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Eurotiomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis vinaria</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus sydowii</i>	0.00%	0.07%	0.00%	0.03%	0.00%	0.44%	0.05%	0.52%	54.30%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Capnodiales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Wallemia mellicola</i>	0.70%	0.02%	0.04%	0.12%	0.01%	9.29%	0.02%	2.14%	0.00%	1.79%	3.13%	0.00%
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	42.80%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium oxalicum</i>	7.34%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.45%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Naganishia albidosimilis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.37%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bullera alba</i>	0.00%	0.32%	0.79%	1.23%	0.00%	0.24%	0.13%	0.26%	0.00%	0.00%	0.39%	0.40%
unclassified <i>Mucoromycota</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Didymellaceae sp. 2 NV-2016</i>	0.00%	0.00%	4.07%	0.00%	0.00%	1.31%	2.67%	0.00%	0.00%	0.00%	3.65%	0.85%
<i>Fusarium fujikuroi</i>	0.00%	0.32%	0.63%	0.92%	0.00%	0.87%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.41%
<i>Rhizopus unclassified Rhizopus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium foetens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	5.02%	0.00%	0.01%	0.00%	5.25%	0.00%	0.00%	1.48%	0.00%
<i>Epicoccum viticis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Dioszegia catanionii</i>	0.19%	0.14%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Wallemia tropicalis</i>	0.16%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.61%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium coryli</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Pleosporales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Ectophoma multirostrata</i>	0.00%	0.24%	0.00%	1.77%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium halotolerans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.76%	0.00%	0.00%
<i>Mucor unclassified Mucor</i>	5.45%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor circinelloides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acrophialophora fusispora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizopus azygosporus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Neocosmospora rubicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chaetomiaceae sp. AN-2017</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Naganishia albida</i>	0.05%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Lichtheimiaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Aspergillus terreus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

표 97-3. 외국산 참깨시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	A1	A2	A3	I1	I2
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.75%	1.28%	0.00%	0.00%	0.00%	15.30%	28.40%
<i>Alternaria simsimi</i>	0.16%	0.00%	21.70%	8.59%	0.00%	0.00%	23.30%	21.10%	21.80%	0.00%	0.00%
<i>Corynespora torulosa</i>	0.00%	3.07%	0.04%	5.19%	0.85%	0.00%	3.12%	2.19%	4.84%	2.64%	8.61%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	10.90%	0.00%	18.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	9.44%	0.00%	49.10%
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0.00%	0.00%	4.83%	0.00%	1.18%	0.84%	11.40%	0.00%	0.00%	11.40%	0.00%
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	46.60%	28.20%	23.60%	0.00%	0.00%	0.00%	9.01%	0.00%	20.20%	0.00%
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.00%	16.90%	4.97%	4.27%	0.00%	0.75%	21.80%	29.80%	29.00%	3.40%	0.89%
<i>Filobasidium magnum</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.02%	0.08%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.10%	0.05%
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Plectosphaerellaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.18%	0.22%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus appendiculatus</i>	0.00%	0.00%	9.06%	0.09%	16.90%	0.00%	0.00%	0.83%	3.50%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	52.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.16%	0.00%
<i>Moesziomyces rugulosus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	6.48%	0.14%	0.85%	0.00%	0.75%	0.38%	0.55%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.00%	1.17%	0.00%	0.78%	0.28%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Eurotiomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	50.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis vinaria</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.03%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus sydowii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Capnodiales</i>	0.00%	8.90%	0.69%	15.30%	0.34%	0.00%	4.77%	6.78%	9.43%	3.18%	0.04%
<i>Walleria mellicola</i>	0.00%	0.15%	0.30%	0.01%	0.02%	0.00%	0.11%	0.03%	0.02%	0.01%	0.06%
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2.69%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium oxalicum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.48%	0.00%
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.00%	0.13%	0.00%	0.00%	0.00%	28.70%	1.43%	0.78%	0.00%	1.04%	0.00%
<i>Naganishia albidosimilis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	13.50%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.23%	0.00%
<i>Bullera alba</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.55%
unclassified <i>Mucoromycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Didymellaceae sp. 2 NV-2016</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium fujikuroi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.16%	0.47%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.88%	0.00%
<i>Rhizopus unclassified Rhizopus</i>	0.00%	3.48%	4.07%	5.21%	0.06%	0.19%	0.01%	0.02%	0.01%	0.06%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0.00%	0.00%	0.53%	0.00%	0.00%	0.00%	6.43%	10.30%	7.68%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium foetens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoecum viticis</i>	0.00%	2.60%	0.82%	3.62%	0.00%	0.00%	3.21%	3.02%	0.00%	1.30%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	14.60%	0.00%	0.00%	0.00%	4.21%
<i>Dioszegia catarinonii</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.13%	0.01%
<i>Walleria tropicalis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.39%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium coryli</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.08%	0.13%	0.06%	0.02%	0.00%
unclassified <i>Pleosporales</i>	0.00%	0.00%	5.77%	0.02%	0.00%	1.18%	0.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Ectophoma multirostrata</i>	4.27%	0.00%	0.00%	0.00%	0.87%	0.00%	0.00%	0.00%	3.39%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium halotolerans</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor unclassified Mucor</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor circinelloides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acrophialophora fusispora</i>	0.00%	0.00%	3.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.47%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhizopus azygosporus</i>	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	1.62%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Neocosmospora rubicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chaetomiaceae sp. AN-2017</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Naganishia albida</i>	45.30%	0.53%	0.00%	0.81%	0.69%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.02%
unclassified <i>Lichtheimiaceae</i>	10.60%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	4.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus terreus</i>	8.21%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

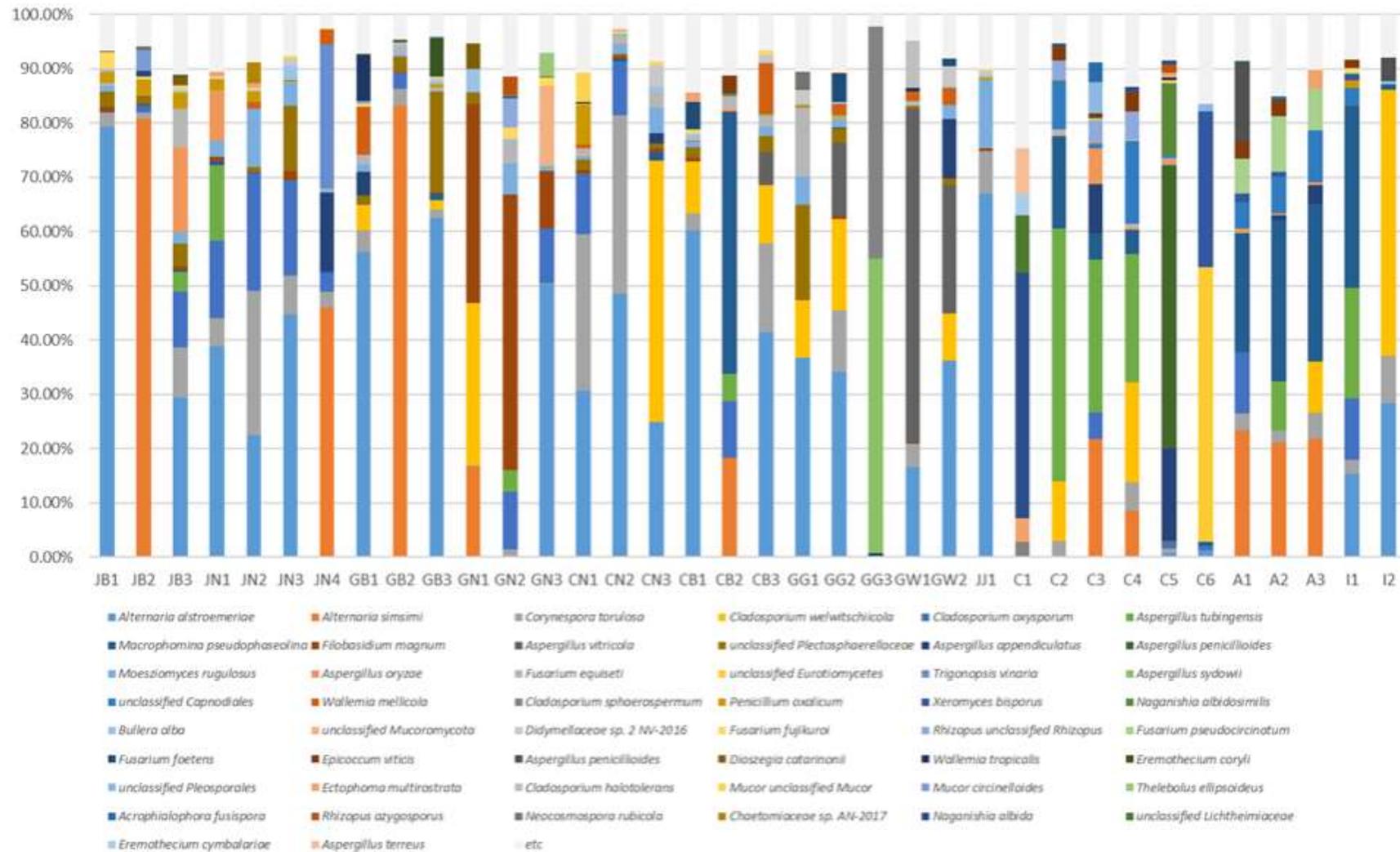


그림 154. 참깨 진균 군집내의 species 분포 (%ratio)

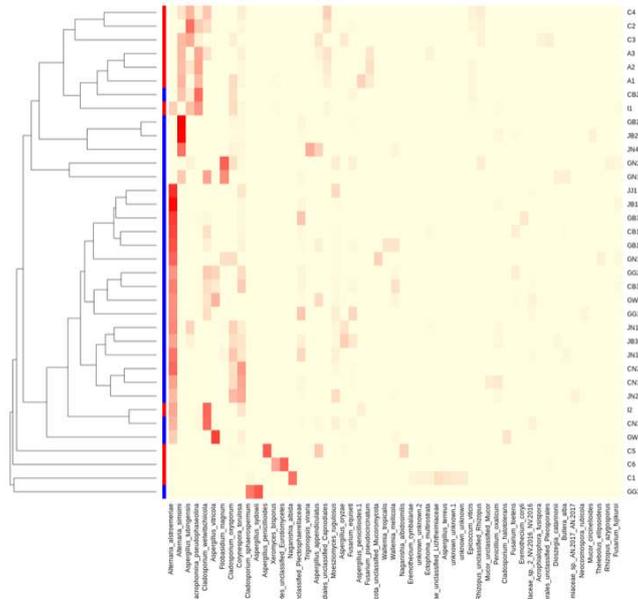


그림 155. 참깨 진균 군집의 종 (species) 수준에서의 heatmap 분석

그림 155와 같이 heatmap으로 나타내면 *Alternaria astroemeriae*나 *Alternaria simsimi* 같은 *Alternaria*속 곰팡이들의 비율이 높은게 대부분인 국내산과 그렇지 않은 외국산이 어느정도 구별되는 것을 알 수 있다.

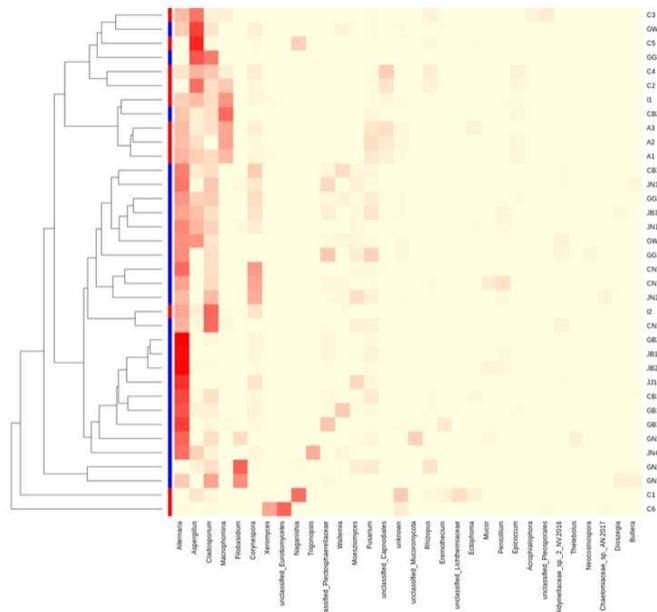


그림 156. 참깨 진균 군집의 속 (genus) 수준에서의 heat map 분석.

표 98, 그림 155, 156는 국내산과 국외산 참깨 시료들에서 얻어진 진균 군집을 속 (genus) 수준에서 비교 분석한 것으로 종 (species) 수준에서 비교분석 보다는 한결 단순화되었고 예외가 있기는 하지만, 대체로 국내산과 외국산이 서로 분리됨을 알 수 있다.

표 98-1. 국내산 참깨시료들의 진균군집 genus 분포 (%ratio)

	JB1	JB2	JB3	JN1	JN2	JN3	JN4	GB1	GB2	GB3	GN1	GN2	GN3
<i>Alternaria</i>	79.40%	80.70%	29.50%	38.90%	22.40%	44.80%	45.90%	56.20%	83.10%	62.40%	16.80%	0.01%	50.30%
<i>Aspergillus</i>	0.02%	1.60%	20.10%	23.20%	0.49%	1.23%	14.60%	4.63%	0.53%	0.08%	0.00%	4.13%	0.02%
<i>Cladosporium</i>	0.00%	0.94%	10.20%	14.20%	21.70%	17.50%	3.61%	4.66%	3.08%	1.67%	29.90%	10.50%	10.10%
<i>Corynespora</i>	2.60%	1.27%	9.14%	5.21%	26.70%	7.05%	2.92%	3.98%	3.12%	1.67%	0.17%	1.50%	0.08%
<i>Macrophomina</i>	0.15%	0.00%	0.29%	0.70%	0.00%	0.00%	0.26%	0.07%	0.02%	1.28%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Filobasidium</i>	0.76%	0.12%	0.64%	0.85%	0.17%	1.74%	0.04%	0.02%	0.15%	0.09%	36.60%	50.70%	10.60%
<i>Fusarium</i>	3.75%	1.57%	7.83%	0.36%	3.36%	1.51%	0.57%	2.22%	1.69%	0.73%	0.47%	6.27%	2.67%
<i>unclassified_Plectosphae</i>	2.79%	1.39%	4.30%	0.00%	0.86%	12.10%	0.00%	1.61%	2.75%	8.60%	2.17%	0.00%	0.00%
<i>Moesziomyces</i>	1.17%	0.01%	2.09%	2.97%	10.80%	4.20%	0.19%	1.33%	0.25%	0.24%	0.01%	5.73%	0.85%
<i>Wallemia</i>	0.01%	0.02%	0.43%	0.03%	1.93%	0.03%	2.79%	7.10%	0.24%	0.05%	0.00%	0.04%	0.04%
<i>unclassified_Eurotiomyc</i>	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	26.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified_Capnodiales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium</i>	1.99%	2.88%	2.85%	2.08%	1.81%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.80%	0.14%	0.00%	0.00%
<i>Xeromyces</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unknown</i>	0.10%	0.16%	0.89%	0.41%	1.09%	0.73%	0.06%	0.21%	0.12%	1.01%	0.13%	0.35%	0.15%
<i>Rhizopus</i>	0.00%	0.00%	0.22%	0.12%	0.14%	0.01%	0.07%	0.96%	0.00%	0.00%	0.00%	8.87%	0.01%
<i>Naganishia</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.02%	0.00%	0.05%	0.02%	0.00%	0.02%	1.17%	0.06%
<i>Bullera</i>	0.52%	0.04%	0.25%	0.19%	0.44%	2.63%	0.03%	0.02%	0.71%	0.38%	4.18%	0.28%	0.25%
<i>unclassified_Mucoromyc</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	14.50%
<i>Didymella sp_2_NV</i>	0.00%	0.00%	0.55%	0.00%	0.00%	1.49%	0.00%	0.00%	0.00%	0.77%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor</i>	0.10%	3.91%	0.07%	0.14%	0.04%	0.00%	0.02%	0.05%	0.00%	0.18%	0.35%	0.27%	1.68%
<i>Epicoccum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.86%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Dioszegia</i>	0.02%	0.00%	1.67%	0.00%	0.01%	0.03%	0.00%	0.01%	0.23%	0.00%	4.57%	0.03%	0.04%
<i>Eremothecium</i>	0.11%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.26%	0.14%	7.16%	0.00%	0.31%	0.00%
<i>unclassified_Pleosporales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.03%	0.00%
<i>Ectophoma</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.99%	0.81%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Thelebolus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.43%
<i>Chaetomiaceae sp_AN-</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.87%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acrophialophora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Neocosmospora</i>	0.01%	0.60%	0.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified_Lichtheimia</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%

표 98-2. 국내산 참깨시료들의 진균군집 genus 분포 (%ratio)

	CN1	CN2	CN3	CB1	CB2	CB3	GG1	GG2	GG3	GW1	GW2	J1
<i>Alternaria</i>	30.70%	48.60%	24.90%	60.20%	18.30%	41.40%	36.80%	34.10%	0.02%	16.50%	36.20%	66.90%
<i>Aspergillus</i>	0.25%	0.29%	1.97%	1.68%	5.65%	6.58%	0.08%	14.50%	54.90%	61.50%	34.60%	0.08%
<i>Cladosporium</i>	11.10%	10.00%	48.10%	9.58%	10.50%	10.80%	10.50%	16.90%	42.80%	8.76%	8.61%	0.01%
<i>Corynespora</i>	28.80%	32.80%	0.01%	3.13%	0.00%	16.40%	0.02%	11.30%	0.01%	4.38%	0.02%	7.83%
<i>Macrophomina</i>	0.08%	0.37%	1.70%	0.00%	48.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Filobasidium</i>	0.67%	0.64%	0.64%	0.62%	0.11%	0.03%	0.05%	0.50%	0.00%	0.17%	0.05%	0.66%
<i>Fusarium</i>	1.57%	1.79%	3.67%	6.17%	3.24%	2.74%	14.70%	5.74%	0.00%	1.03%	1.51%	2.22%
<i>unclassified_Plectosphae</i>	1.93%	0.28%	0.87%	2.05%	0.15%	2.90%	7.60%	2.68%	0.00%	0.66%	1.30%	0.00%
<i>Moesziomyces</i>	0.51%	1.81%	4.64%	0.99%	0.02%	1.86%	5.07%	1.48%	0.00%	0.34%	2.49%	12.40%
<i>Wallemia</i>	1.77%	0.02%	0.05%	0.13%	0.01%	10.00%	0.02%	3.90%	0.00%	3.50%	3.19%	0.00%
<i>unclassified_Eurotiomyc</i>	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified_Capnodiales</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium</i>	9.21%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.45%	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%
<i>Xeromyces</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unknown</i>	0.55%	0.02%	0.43%	0.64%	0.70%	0.17%	2.37%	0.85%	0.00%	1.06%	2.28%	0.83%
<i>Rhizopus</i>	0.88%	0.00%	0.00%	1.37%	0.19%	0.00%	0.01%	0.28%	0.00%	0.02%	0.00%	0.03%
<i>Naganishia</i>	0.05%	0.04%	0.00%	0.03%	0.37%	0.01%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bullera</i>	0.00%	0.32%	0.79%	1.23%	0.00%	0.24%	0.13%	0.26%	0.00%	0.00%	0.39%	0.41%
<i>unclassified_Mucoromyc</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Didymella sp_2_NV</i>	0.00%	0.00%	4.07%	0.00%	0.00%	1.31%	2.67%	0.00%	0.00%	0.00%	3.65%	0.85%
<i>Mucor</i>	5.50%	0.02%	0.01%	0.02%	0.00%	0.05%	0.05%	0.07%	0.00%	0.01%	0.09%	0.01%
<i>Epicoccum</i>	0.59%	0.00%	0.00%	0.00%	3.30%	0.00%	0.00%	1.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Dioszegia</i>	0.21%	0.14%	0.24%	0.21%	0.03%	0.09%	0.10%	0.04%	0.00%	0.00%	0.06%	0.07%
<i>Eremothecium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.02%
<i>unclassified_Pleosporales</i>	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Ectophoma</i>	0.00%	0.24%	0.00%	1.77%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Thelebolus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chaetomiaceae sp_AN-2</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acrophialophora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Neocosmospora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%
<i>unclassified_Lichtheimia</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.06%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

표 98-3. 외국산 참깨시료들의 진균군집 genus 분포 (%ratio)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	A1	A2	A3	I1	I2
<i>Alternaria</i>	0.16%	0.00%	21.70%	8.59%	0.75%	1.28%	23.30%	21.10%	21.80%	15.30%	28.40%
<i>Aspergillus</i>	8.21%	46.90%	44.40%	24.20%	70.90%	0.14%	15.70%	10.70%	4.52%	21.50%	4.22%
<i>Cladosporium</i>	2.69%	10.90%	4.83%	18.50%	1.18%	0.84%	11.40%	0.00%	9.44%	11.40%	49.10%
<i>Corynespora</i>	0.00%	3.07%	0.04%	5.19%	0.85%	0.00%	3.12%	2.19%	4.84%	2.64%	8.61%
<i>Macrophomina</i>	0.00%	16.90%	4.97%	4.27%	0.00%	0.75%	21.80%	29.80%	29.00%	33.40%	0.89%
<i>Filobasidium</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.02%	0.17%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.10%	0.05%
<i>Fusarium</i>	0.00%	1.30%	1.28%	0.96%	0.75%	0.00%	7.24%	10.60%	7.70%	0.90%	0.00%
<i>unclassified_Plectosphaerellaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.18%	0.22%	0.00%	0.18%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Moesziomyces</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.02%	0.03%	0.01%	0.03%	0.02%
<i>Wallemia</i>	0.00%	0.15%	0.31%	0.24%	0.41%	0.09%	0.11%	0.03%	0.02%	0.03%	0.89%
<i>unclassified_Eurotiomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.01%	50.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Trigonopsis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.03%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified_Capnodiales</i>	0.00%	8.90%	0.69%	15.30%	0.34%	0.00%	4.77%	6.78%	9.43%	3.18%	0.04%
<i>Penicillium</i>	0.00%	0.00%	0.04%	0.03%	0.04%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	1.60%	0.01%
<i>Xeromyces</i>	0.00%	0.13%	0.00%	0.00%	0.00%	28.70%	1.43%	0.78%	0.00%	1.04%	0.00%
<i>unknown</i>	17.20%	0.27%	0.28%	0.59%	0.49%	5.52%	1.22%	2.04%	1.96%	0.86%	0.12%
<i>Rhizopus</i>	1.97%	3.50%	4.07%	5.45%	1.68%	0.19%	0.01%	0.17%	0.01%	0.11%	0.00%
<i>Naganishia</i>	46.70%	0.53%	0.00%	0.81%	14.30%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.23%	0.02%
<i>Bullera</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.55%
<i>unclassified_Mucoromycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Didymelloaceae_sp_2_NV-2016</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Mucor</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum</i>	0.00%	2.60%	0.82%	3.62%	0.00%	0.00%	3.21%	3.02%	0.00%	1.30%	0.04%
<i>Dioszegia</i>	0.00%	0.03%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.13%	0.01%
<i>Eremothecium</i>	4.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.00%	0.08%	0.14%	0.06%	0.02%	0.00%
<i>unclassified_Pleosporales</i>	0.00%	0.16%	5.77%	0.04%	0.04%	1.30%	0.22%	0.00%	0.02%	0.02%	0.00%
<i>Ectophoma</i>	4.27%	0.00%	0.00%	0.00%	0.87%	0.00%	0.00%	0.00%	3.39%	0.00%	0.00%
<i>Thelebolus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Chaetomiaceae_sp_AN-2017</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.36%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acrophialophora</i>	0.00%	0.00%	3.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.47%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Neocosmospora</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified_Lichtheimiaceae</i>	10.60%	0.07%	0.51%	0.05%	0.00%	0.04%	0.00%	0.03%	0.02%	0.02%	0.00%

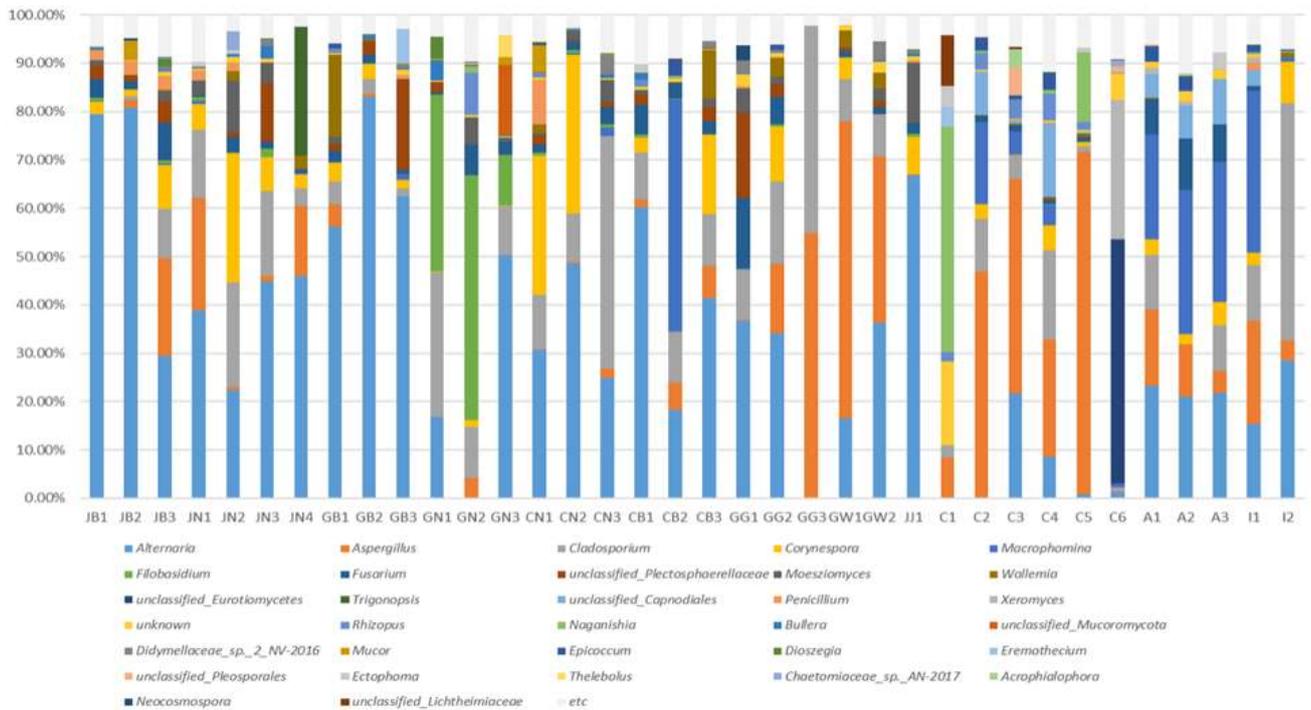


그림 157. 참깨 진균 군집내의 genus 분포 (%ratio)

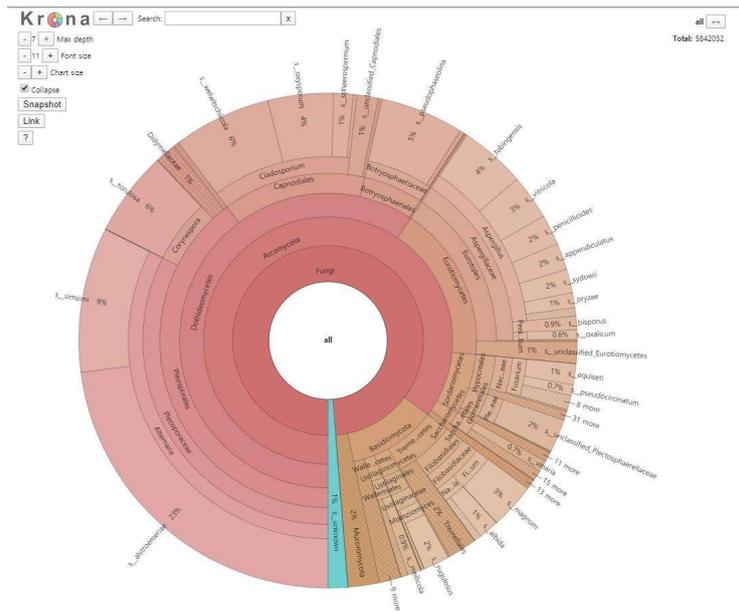


그림 158. 참깨 진균군집의 계통분류학 수준의 상대적 비율분포 차트

Metagenome 분석을 통해 얻어진 진균군집의 OTU들이 속한 종들을 MetaCoMET을 이용하여 계통분류학 수준에서 상대적인 비율분포 (그림 158)를 보면, *Alternaria* 속이 32%, *Aspergillus* 속이 약 16% 정도로 높은 비율을 차지하지만, 세균에 비해서 과점현상이 두드러지지 않는다. 특히, *Aspergillus*속은 전체 비율에서는 *Alternaria* 속 다음으로 많지만, 종 (species) 수준에서는 여러 종들이 균일하게 분포하는 특징을 보인다.

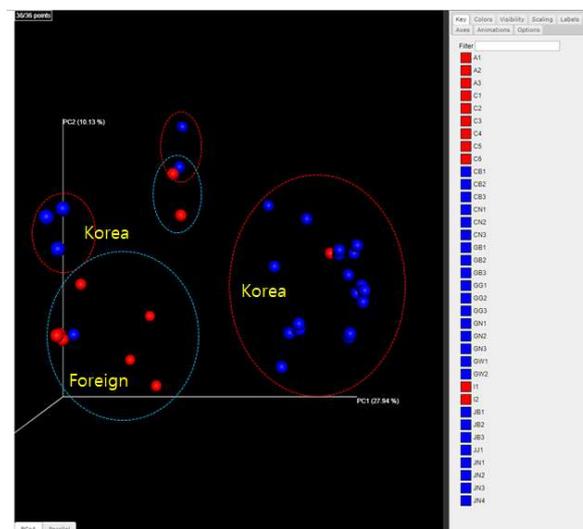


그림 159. 참깨 진균 군집들의 Principal coordinate analysis (PCoA) plot

진균 군집을 주좌표 분석으로 국내산과 외국산의 유사도를 분석해본 결과 (그림 159) 세균군집보다 국내산과 외국산의 차이가 좀더 확연히 구별되는 것을 알 수 있었다. 이런 점을 고려해볼 때 국내산과 국외산 구별에는 세균군집보다 진균 군집이 유리하다는 것을 보여준다.

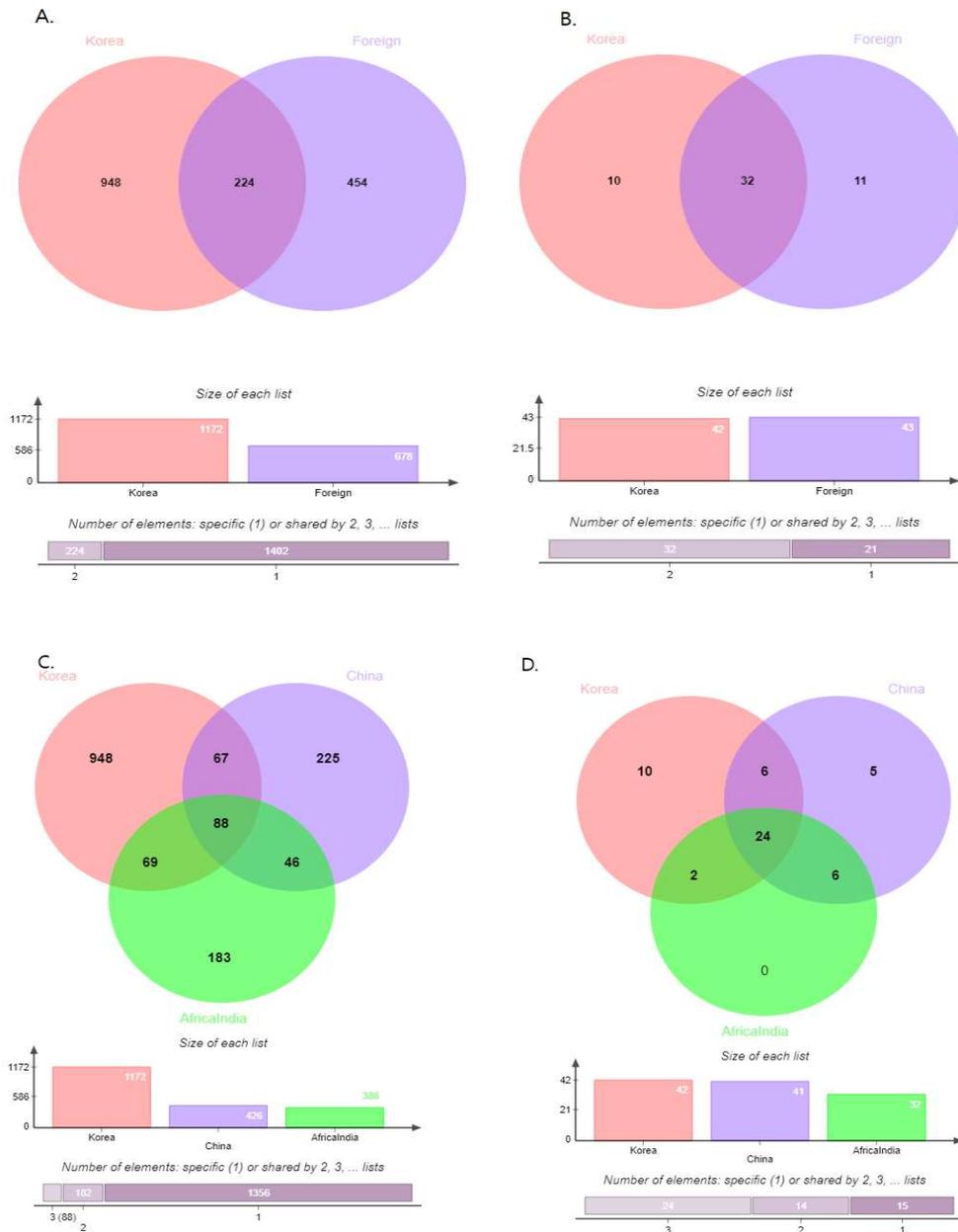


그림 160. 함께 진균군집의 Venn diagram

- 1) A, B는 국내산과 국외산으로 C, D는 국내산, 중국산, 아프리카인도로 나눠 비교
- 2) A, C는 모든 OTU들을 비교, B, D는 하나 이상의 시료에서 3% 이상 발현된 OTU들만 선발해서 비교한 것임



그림 161. 참깨 진균군집의 alpha diversity 분석

- 1) A, B는 국내산과 국외산으로 C, D는 국내산, 중국산, 아프리카인으로 나눠 비교
- 2) A, C는 모든 OTU들을 비교, B, D는 하나 이상의 시료에서 1% 이상 발현된 OTU들만 선별해서 비교한 것임

그림 160, 161은 MetaCoMET을 이용하여 얻은 국내산과 외국산 시료들간의 밴다이어그램과 alpha diversity 분석차트들인데, 아프리카인도산이 국내산 및 중국산과 크게 달랐던 세균군집과는 달리, 국내산이나 외국산의 군집다양성 등의 지표는 서로 비슷했다. 또한, 3% 이상 높은 비율로 존재하는 균들의 개수가 각각 42개와 43개로 비슷하고 국내산에서만 발견된 종과 외국산에서 발견된 종이 각각 10개와 11개나 되는 것으로 보아 군집의 다양성이 균일하면서 군집들간에 차이도 있음을 알 수 있었다.

(4) 농산물 쌀의 미생물 gDNA를 활용하여 메타지놈 시퀀스 생산 및 미생물 군집 분석

(가) 원산지 판별 대상 농산물 쌀 시료 수집

① 국내 원산지 판별 대상 쌀 시료 수집

국내 원산지 판별을 위한 쌀 시료로 2018년에 생산된 경기, 강원, 충북, 경북, 경남, 전북, 7개 도의 품종 오대와 일품 두품종의 각 왕겨 (14), 현미 (14), 백미 (14) 총 42점을 주관기관으로부터 제공 받았다 (표 99).

표 99. 국내 원산지 판별을 위한 쌀 시료 목록

No.	시료번호	도	시군	품종
1	CWO	강원도	철원	오대쌀
2	CCO	강원도	춘천	오대쌀
3	CCI	강원도	춘천	일품쌀
4	SWO	경기도	수원	오대쌀
5	SWI	경기도	수원	일품쌀
6	HSO	경기도	화성	오대쌀
7	HIS	경기도	화성	일품쌀
8	CJO	충청북도	청주	오대쌀
9	CJI	충청북도	청주	일품쌀
10	JJO	전라북도	전주	오대쌀
11	JJI	전라북도	전주	일품쌀
12	SJO	경상북도	상주	오대쌀
13	SJI	경상북도	상주	일품쌀
14	MYI	경상남도	밀양	일품쌀

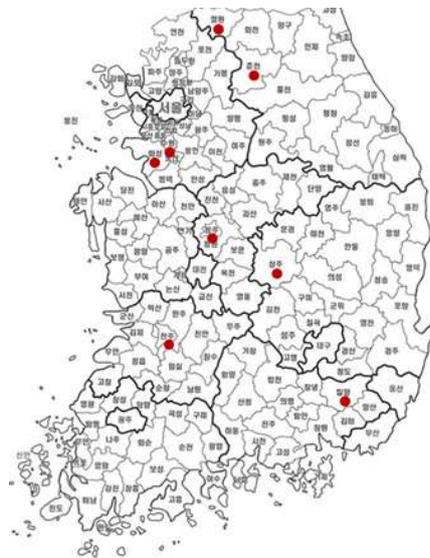


그림 162. 국내 원산지 판별 쌀 시료 수집 위치

② 중국 원산지 판별을 위한 시료 수집

중국 원산지 판별을 위한 시료로 2018년에 생산된 15지역의 현미와 백미 각 15점을 주관 기관 (이화여대)으로부터 제공받아, 생산지역의 기후에 따라 구분하였다 (표 100).

표 100. 중국 원산지 판별을 위한 쌀 시료 목록

	도	시
1	헤이룽장성 (Heilongjiang)	허강 (hegang)
2	헤이룽장성 (Heilongjiang)	쌍야산 (shuangyashan)
3	헤이룽장성 (Heilongjiang)	자무쓰 (Jiamusi)
4	헤이룽장성 (Heilongjiang)	하얼빈 (Haerbin)
5	허난성 (Henan)	난양 (Nanyang)
6	허난성 (Henan)	신상 (Xinxiang)
7	허난성 (Henan)	상구 (Shangqiu)
8	장쑤성 (jiangsu)	타이저우 (taizhou)
9	랴오닝성 (liaoning)	후루다오 (Huludao)
10	산둥성 (Shandong)	짜오좡 (Zaozhuang)
11	산둥성 (Shandong)	린이 (Linyi)
12	산둥성 (Shandong)	타이안 (Taian)
13	산시성 (shangxi)	창지 (changzhi)
14	후베이성 (Hubei)	황강 (Huanggang)
15	쓰촨성 (Sichuan)	난충 (Nanchong)



그림 163. 중국 원산지 판별 쌀 시료 수집 위치

(나) 미생물 DNA 추출법 개선 및 비교 분석

① 연구 수행 방법

본 연구에서는 대상 농산물의 특성과 미생물의 특성, 즉 부생적으로 농산물 겉면의 환경으로부터 유래한 미생물 군집, 농산물 (작물) 세포 내부에 기생 또는 공생을 하는 미생물 군집을 분석하는 것이 목적이다. 따라서 대상 농산물(식물) 자체의 genomic DNA (gDNA)가 최대한 혼입되지 않고 순도가 높은 미생물 total DNA를 확보하는 것이 관건이다. 2차년도에 연구 결과를 바탕으로 확립한 효율이 높은 phosphate-buffered saline (PBS) 여과 방법과 PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO, cat# 12855-50)를 이용하여 참깨의 겉면으로부터 기인하여 군집을 이루고 있는 미생물의 DNA를 추출하였다. 그림 164에 쌀로부터 미생물 total DNA를 추출하는 과정을 도시하였다.



그림 164. 쌀로부터 미생물 total DNA 추출 과정

농산물 자체의 gDNA가 최대한 혼입되지 않게 미생물 total DNA를 확보하기 위하여 쌀 50g을 PBS buffer 200에 4°C에서 24시간 침지후 25°C, 180 rpm 1시간 진탕하였다. 진탕한 PBS buffer를 공극 크기 100 μm의 cheesecloth filter로 여과한 후 13,000rpm, 10분간 원심 분리한 Pellet을 PowerSoil gDNA extraction kit으로 미생물 total DNA 추출하였다. Nanodrop (Thermofisher, USA)으로 미생물 total DNA의 농도를 측정 후 표 101의 primer set으로 세균과 진균 대상 유전자 유무를 확인하기 위하여 PCR 증폭하고 전기영동으로 확인하였다.

표 101. 쌀의 미생물 gDNA로부터 세균, 진균 확인을 위한 primer 목록

Target	Primer Name	Sequence	Ref.
Bacteria	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3'	Wang <i>et al.</i> (2018)
	ITS2	5'-GCTGCGTTCCTCATCGATGC-3'	
Fungi	799F	5'-AACMGGGA TTA GAT ACCCKG-3'	Gardes & Bruns (1993)
	1193R	5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3'	

② 연구 결과

왕겨, 현미, 백미 50g을 PBS buffer 200mL에 넣고 4°C에서 24시간 동안 침지하여 미생물 total DNA를 추출하여 표 102, 103에 각 시료의 미생물 gDNA 농도를 정리하였다.

표 102. 원산지 판별을 위한 쌀 (왕겨) 시료의 미생물 total DNA 농도

	시료명	지역	왕겨	gDNA 농도 (ng/uL)
1	CWO	강원도 철원 오대	○	189.7
2	CCO	강원도 춘천 지적 오대	○	1.2
3	CCI	강원도 춘천 지적 일품	○	126.9
4	SWO	경기도 수원 오대	○	157.7
5	SWI	경기도 수원 일품	○	156.3
6	HSO	경기도 화성 오대	○	1.1
7	HSI	경기도 화성 일품	○	119.4
8	MYI	경상남도 밀양 일품	○	137.7
9	SJO	경상북도 상주 오대	○	1.7
10	SJI	경상북도 상주 일품	○	106.0
11	JJO	전라북도 전주 오대	○	5.1
12	JJI	전라북도 전주 일품	○	127.6
13	CJO	충청북도 청주 오대	○	151.8
14	CJI	충청북도 청주 일품	○	133.9

표 103. 원산지 판별을 위한 쌀(현미/백미) 시료의 미생물 total DNA 농도

No	시료명	시료명	현미	백미	g DNA 농도 (ng/uL)
1	CCO-2	춘천오대 현미	○		114.1
2	HSO-2	화성오대 현미	○		60.49
3	SWO-2	수원오대 현미	○		63.04
4	CJO-2	청주오대 현미	○		45.1
5	JJO-2	전주오대 현미	○		30.69
6	SJO-2	상주오대 현미	○		54.31
7	HLH-2	헤이룽장성 허강 현미	○		15.88
8	HNX-2	허난성 신샹 현미	○		22.84
9	JST-2	장쑤성 타이저우 현미	○		85.78
10	LOH-2	랴오닝성 후루다오 현미	○		15.98
11	SDT-2	산둥성 타이안 현미	○		31.18
12	SXC-2	산시성 창지 현미	○		30.29
13	HUH-2	후베이성 황강 현미	○		48.82
14	SCN-2	쓰촨성 난충 현미	○		11.08
15	CCO-3	춘천오대 백미		○	45.98
16	HSO-3	화성오대 백미		○	11.08
17	JJO-3	전주오대 백미		○	5.29
18	HLH-3	헤이룽장성 허강 백미		○	8.33
19	HNX-3	허난성 신샹 백미		○	15.78
20	LOH-3	랴오닝성 후루다오 백미		○	7.65

왕겨의 미생물 gDNA를 추출하여 세균과 진균 미생물 균집 분석 후, 국내산과 중국산의 지역별로 선정하여 현미 14개, 백미 6개 시료를 (주)마크로젠에 시료를 의뢰하였으며 진균 ITS 메타지놈 시퀀싱 NGS Library QC 결과 표 104, 105와 같이 통과하였다.

표 104. 원산지 판별을 위한 쌀(왕겨) 시료의 Metagenome Amplicon 농도

시료명	지역	왕겨	ITS amplicon (ng/ul)	16S amplicon (ng/ul)	
1	CWO	강원도 철원 오대	0	40.23	74.81
2	CCO	강원도 춘천 지적 오대	0	38.67	62.6
3	CCI	강원도 춘천 지적 일품	0	39.14	69.06
4	SWO	경기도 수원 오대	0	34.22	72.90
5	SWI	경기도 수원 일품	0	35.00	73.57
6	HSO	경기도 화성 오대	0	12.99	69.90
7	HSI	경기도 화성 일품	0	31.31	77.92
8	MYI	경상남도 밀양 일품	0	48.67	63.91
9	SJO	경상북도 상주 오대	0	42.66	63.67
10	SJI	경상북도 상주 일품	0	32.71	70.26
11	JJO	전라북도 전주 오대	0	20.19	60.36
12	JJI	전라북도 전주 일품	0	38.46	70.26
13	CJO	충청북도 청주 오대	0	31.31	66.80
14	CJI	충청북도 청주 일품	0	40.22	72.96

표 105. 원산지 판별을 위한 쌀(현미/백미) 시료의 Metagenome Amplicon 농도

No	시료명	시료명	현미	백미	ITS amplicon (ng/ul)
1	CCO-2	춘천오대 현미	0		29.38
2	HSO-2	화성오대 현미	0		11.61
3	SWO-2	수원오대 현미	0		12.40
4	CJO-2	청주오대 현미	0		10.00
5	JJO-2	전주오대 현미	0		34.99
6	SJO-2	상주오대 현미	0		27.17
7	HLH-2	헤이룽장성 허강 현미	0		48.15
8	HNX-2	허난성 신샹 현미	0		58.77
9	JST-2	장쑤성 타이저우 현미	0		59.44
10	LOH-2	랴오닝성 후루다오 현미	0		11.54
11	SDT-2	산둥성 타이안 현미	0		53.82
12	SXC-2	산시성 창지 현미	0		16.26
13	HUH-2	후베이성 황강 현미	0		10.00
14	SCN-2	쓰촨성 난충 현미	0		44.65
15	CCO-3	춘천오대 백미		0	18.00
16	HSO-3	화성오대 백미		0	18.26
17	JJO-3	전주오대 백미		0	10.96
18	HLH-3	헤이룽장성 허강 백미		0	11.51
19	HNX-3	허난성 신샹 백미		0	63.92
20	LOH-3	랴오닝성 후루다오 백미		0	33.77

(다) 농산물 쌀로부터 선택배지 활용한 상이한 미생물 (진균류)군의 선택적 분리 및 동정

① 연구 수행 방법

미생물 total DNA를 추출하기 위하여 전처리 한 쌀시료를 PBS buffer에 침지하여 미생물 total DNA를 추출하기 위하여 얻은 미생물 pellet을 1mL PBS buffer에 현탁하여 진균 선택 배지인 Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC배지 ; Peptone 0.5%, Glucose 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 0.2% Dichloran 1.0 ml, Rose bengal 0.0025%, Chloramphenicol 0.01%, Agar 1.5%)고체평판 배지에 100 μL 씩 도말하여 25°C에서 5일간 관찰하였다. 그리고 미생물 균집 분석 후 유의미한 미생물을 분리 동정하기 위하여 100 μL 를 20% glycerol에 현탁하여 -80°C에 보관하였다.

② 연구 결과

본 연구에 원산지 관별을 위한 참깨 시료는 식량자원으로 시장에서 먹거리로 판매되는 상품이므로, 쌀의 겉표면이나 내생하고 있는 미생물의 농도가 낮을 것으로 예상하고, NGS 기법으로 정보를 생산하여 분석한 미생물군집에서 얻은 결과와 비교하여 유용한 미생물을 분리·동정하고 그 결과로부터 유용한 유전자를 선별하기 위하여 시도하였다. 쌀 시료 50g으로부터 얻은 미생물 pellet의 현탁액을 도말하여 미생물이 존재하는 것을 확인하였고 미생물 균집 분석 후 유의미한 미생물을 분리 동정할 예정이다.

(라) 메타지노믹스 시퀀스 데이터 생산, 분석 및 가공

① NGS 기법에 의한 유전체 정보 생산

㉠ 연구수행방법

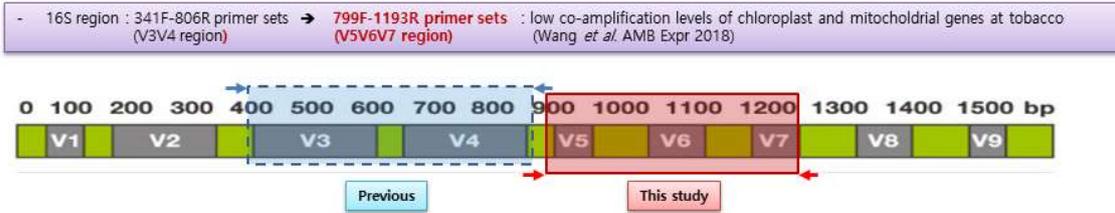
지금까지 사용한 세균의 16S rRNA의 V3V4 region을 증폭하기 위한 341F-806R primer 쌍과 진균의 ITS2 region을 증폭하기 위한 ITS3-ITS4 primer 쌍은 식물 chloroplast와 mitochondria의 16S rRNA와 식물 chromosome내의 ITS region도 함께 증폭되는 문제가 있어서 DNA prep 과정에서 농산물 자체 gDNA를 최소화해야 하는 어려움이 있었고, 1차년도 중국산 대두에서의 경우와 같이 얻어진 데이터의 대부분이 대두에서 유래한 것이어서 비교분석이 어려운 문제가 생길 수 있었다.

그래서 문헌검색을 통해서 세균의 16S rRNA 분석용 primer 쌍은 담배에서 chloroplast와 mitochondrial DNA의 증폭이 적다고 보고된 (Wang et al. 2018) V5V6V7 region을 증폭하는 799F-1193R primer 쌍으로 교체하였고, 진균의 ITS 분석용 primer 쌍은 Fungal-specific으로 알려진 ITS1F (Gardes & Bruns 1993)을 이용하기 위해 ITS1F-ITS2 primer 쌍으로 교체하고 (표 106, 그림 165), (주)마크로젠에 메타지노믹스 서비스를 의뢰하였다.

표 106. NGS library 제작을 위한 PCR primer 목록

Target	Primer Name	Sequence	Ref.
Bacteria	ITS1F	5' -CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3'	Wang <i>et al.</i> (2018)
	ITS2	5' -GCTGCGTTCCTTCATCGATGC-3'	
Fungi	799F	5' -AACMGGGA TTA GAT ACCCKG-3'	Gardes & Bruns (1993)
	1193R	5' -ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3'	

■ 16S region



■ ITS region

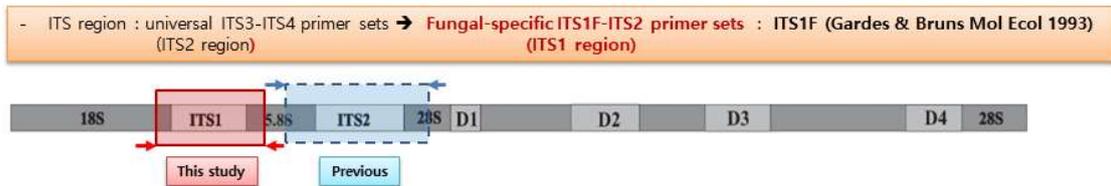


그림 165. 새로 변경된 세균 16S와 진균 ITS 지역 primer 증폭지역 모식도

㉔ 연구결과

벼의 원산지별 미생물 군집분석을 위해 왕겨, 현미, 백미를 분석하기로 하였는데, 일단 시료 확보가 용이한 국내산 왕겨를 먼저 시도하였는데, 8개 지역의 오대벼 (O)와 일품벼 (I) 14개 시료에서 세균 16S NGS sequencing data와 진균 ITS NGS sequencing data를 생산하였다 (표 107). 새로운 fungal-specific ITS primer 쌍을 이용해서 1차로 벼 왕겨를 분석해본 결과 지금까지 극복하기 힘들었던 식물 gDNA 과증폭에 의한 문제점이 해결되고 군집분포에서 흥미로운 결과가 나와서 현미와 백미의 ITS 분석도 진행하였다.

왕겨의 ITS분석은 16S와 동일한 국내산 16개 시료를 분석했고, 현미는 14개의 시료 (국내산 6개, 중국산 8개), 백미는 6개의 시료 (국내산 3개, 중국산 3개)를 분석하였다 (표 108).

표 107. 벼 왕겨내의 세균 16S 메타지놈 시퀀스 생산정보

Sample		Total Bases	Read Count	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
1-CCO_16S	춘천O	82,694,332	274,732	54.16	45.84	88.62	78.14
2-CCI_16S	춘천I	78,288,896	260,096	53.69	46.31	89.16	78.73
3-SJO_16S	상주O	88,808,846	295,046	54.32	45.68	87.89	77.21
4-SJI_16S	상주I	76,776,672	255,072	53.95	46.05	89.34	78.73
5-JJO_16S	전주O	80,124,996	266,196	54.40	45.60	88.80	78.30
6-JJI_16S	전주I	85,080,058	282,658	54.12	45.88	89.14	78.85
7-MYI_16S	밀양I	80,731,812	268,212	54.17	45.83	89.41	79.17
8-SWO_16S	수원O	74,002,054	245,854	53.91	46.09	89.09	78.62
9-SWI_16S	수원I	72,335,116	240,316	53.69	46.31	89.14	78.65
10-HSO_16S	화성O	74,629,338	247,938	53.88	46.12	88.92	78.45
11-HSI_16S	화성I	76,431,124	253,924	53.66	46.34	89.60	79.41
12-CJO_16S	상주O	72,535,582	240,982	53.39	46.61	89.44	79.28
13-CJI_16S	상주I	83,817,062	278,462	54.28	45.72	89.36	79.22
14-CWO_16S	철원O	74,123,658	246,258	54.21	45.79	89.16	78.81

표 108-1. 벼 왕겨내의 진균 ITS metagenome sequence 생산 정보

Sample		Total Bases	Read Count	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
1-CCO_ITS	춘천O	85,030,694	282,494	45.08	54.92	84.61	76.04
2-CCI_ITS	춘천I	91,035,042	302,442	44.81	55.19	85.18	76.58
3-SJO_ITS	상주O	80,957,562	268,962	45.90	54.10	85.52	76.63
4-SJI_ITS	상주I	79,779,448	265,048	45.33	54.67	85.13	76.45
5-JJO_ITS	전주O	80,271,884	266,684	45.53	54.47	82.40	73.55
6-JJI_ITS	전주I	72,374,848	240,448	45.30	54.70	86.21	77.81
7-MYI_ITS	밀양I	74,587,800	247,800	45.43	54.57	86.02	77.30
8-SWO_ITS	수원O	91,672,560	304,560	47.47	52.53	84.08	74.91
9-SWI_ITS	수원I	83,889,904	278,704	44.60	55.40	86.28	77.96
10-HSO_ITS	화성O	88,294,136	293,336	44.89	55.11	83.36	74.83
11-HSI_ITS	화성I	88,916,604	295,404	44.64	55.36	86.19	78.06
12-CJO_ITS	상주O	77,924,686	258,886	45.52	54.48	84.41	75.72
13-CJI_ITS	상주I	96,307,960	319,960	45.17	54.83	84.24	75.49
14-CWO_ITS	철원O	87,471,202	290,602	46.12	53.88	85.54	76.85

표 108-2. 벼 현미내의 진균 ITS metagenome sequence 생산 정보

Sample		Total Bases	Read Count	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
CCO-2	춘천2	118,953,996	395,196	46.10	53.90	85.23	76.85
HSO-2	화성2	89,279,610	296,610	45.25	54.75	79.17	69.58
SWO-2	수원2	97,526,408	324,008	45.10	54.90	79.32	69.97
CJO-2	청주2	99,619,562	330,962	44.91	55.09	73.94	64.04
JJO-2	전주2	113,933,316	378,516	45.48	54.52	86.79	78.65
SJO-2	상주2	118,216,546	392,746	45.55	54.45	87.21	79.09
HLH-2	헤이룽장2	137,172,924	455,724	46.22	53.78	88.46	80.77
LOH-2	랴오닝2	112,574,000	374,000	44.59	55.41	74.68	64.99
SXC-2	산시2	124,005,980	411,980	42.81	57.19	77.85	69.75
SDT-2	산둥2	130,686,976	434,176	53.67	46.33	85.37	76
HNX-2	허난2	136,304,238	452,838	50.01	49.99	86.85	78.65
SCN-2	쓰촨2	140,293,692	466,092	53.91	46.09	85.49	75.28
HUH-2	후베이2	104,381,382	346,782	44.91	55.09	76.82	67.54
JST-2	짱쑤2	142,104,508	472,108	51.03	48.97	87.57	79.13

표 108-3. 벼 백미내의 진균 ITS metagenome sequence 생산 정보

Sample		Total Bases	Read Count	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
CCO-3	춘천O3	101,969,770	338,770	49.59	50.41	83.18	73.27
HSO-3	화성O3	124,083,638	412,238	50.18	49.82	82.61	72.59
JJO-3	전주O3	85,828,946	285,146	48.50	51.51	82.53	72.69
HLH-3	헤이룽장3	101,121,552	335,952	49.41	50.59	82.65	73.12
LOH-3	랴오닝3	138,942,202	461,602	52.67	47.33	85.25	76.05
HNX-3	허난3	117,199,768	389,368	51.32	48.68	86.82	78.16

(바) 메타지놈 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 (community) 분석

Lotus pipeline을 이용하여 분석하고, NCBI nr database와 microbial 16S RNA database 대신 NCBI에서 reference material을 이용하여 만든 16S ribosomal RNA sequence database와 fungi type ITS database를 이용하여 종동정을 하였다.

① 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석

벼 왕겨내의 세균 군집분석을 위한 16S rRNA 분석결과 시료별로 약 12만에서 15만쌍의 Raw reads를 얻었고, 3개 시료를 제외한 대다수가 bacterial OTUs에 50% 이상 aligned되었고, 나머지 3개 시료도 최소 3만쌍이 align되어 통계적으로도 아무런 문제가 없었다 (표 109). 국내산 왕겨에서 얻어진 bacterial OTU들은 22개에서 44개로 참깨에 비해서 훨씬 적은데, 이는 군집내에 소수의 세균들만 존재한다는 것을 의미한다.

표 109. Lotus pipeline로 분석한 왕겨내의 세균 16S metagenome 요약

16S	Raw	OTUs	Aligned	%aligned
철원O	123,129	32	69,211	56.2%
춘천O	137,366	44	68,859	50.1%
춘천I	130,048	26	81,207	62.4%
수원O	122,927	31	75,358	61.3%
수원I	120,158	26	62,689	52.2%
화성O	123,969	36	59,177	47.7%
화성I	126,962	29	78,200	61.6%
청주O	120,491	34	76,456	63.5%
청주I	139,231	31	80,381	57.7%
전주O	133,098	38	47,844	35.9%
전주I	141,329	31	90,875	64.3%
상주O	147,523	34	79,699	54.0%
상주I	127,536	22	30,449	23.9%
밀양I	134,106	32	70,593	52.6%

표 110과 그림 166는 14개의 국내산 왕겨의 세균군집을 종 (species) 수준에서 비교분석한 것으로 *Pantoea agglomerans*, *Pantoea anthophila*, *Pseudomonas oryzihabitansm*, *Paenibacillus bovis* 등 소수의 세균들이 과점하고 있음을 보여주는데, 종 수준의 비교분석으로는 이들간의 공통점이나 차이점을 구별하기 어렵다. 그림 168는 왕겨내 세균군집에대한 heatmap 분석인데, 소수의 종이 과점하고 있음을 시각적으로 보여주지만, 오대와 일품벼간의 차이는 구별하긴 어려웠다.

표 110. 왕겨 세균군집 species 분포표 (% ratio)

sample	춘천O	춘천I	상주O	상주I	전주O	전주I	밀양	수원O	수원I	화성O	화성I	청주O	청주I	철원O
<i>Pantoea agglomerans</i>	8.51%	13.50%	13.10%	0.00%	10.30%	50.70%	49.20%	11.80%	44.10%	0.00%	43.00%	5.33%	11.60%	0.00%
<i>Pantoea anthophila</i>	8.99%	48.40%	2.62%	25.30%	6.14%	7.90%	20.40%	10.90%	22.00%	11.20%	16.20%	16.80%	14.00%	66.10%
<i>Pseudomonas oryzae</i>	0.00%	5.64%	49.30%	55.40%	9.49%	19.30%	0.00%	2.45%	4.93%	50.10%	15.80%	8.40%	57.80%	11.40%
<i>Paenibacillus bovis</i>	0.00%	15.50%	0.00%	2.78%	2.35%	1.96%	3.33%	11.00%	13.40%	3.27%	0.00%	41.80%	0.00%	5.66%
<i>Kosakonia cowanii</i>	0.00%	3.53%	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	8.12%	46.60%	0.00%	2.14%	8.45%	10.70%	0.00%	4.31%
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	11.40%	0.00%	0.00%	0.00%	20.30%	3.62%	0.00%	0.00%	0.72%	14.80%	0.00%	4.12%	0.00%	2.63%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	49.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	3.18%	3.44%	0.00%	2.16%	6.37%	1.75%	2.84%	0.00%	0.00%	2.12%	6.04%	0.54%	1.47%	2.04%
<i>Pantoea deleyi</i>	0.00%	7.18%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.77%	4.81%	5.20%	0.00%	2.15%	2.11%	0.00%	0.00%
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.00%	0.85%	2.05%	0.00%	7.36%	2.17%	2.45%	1.67%	1.83%	2.08%	0.65%	2.37%	3.65%	0.00%
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	2.90%	0.00%	2.99%	2.92%	11.30%	1.43%	0.00%	1.25%	0.78%	0.00%	0.44%	0.97%	2.17%	1.91%
<i>Methylobacterium indicum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	3.60%	9.39%	5.11%	0.00%	1.28%	1.65%	0.00%	0.97%	2.31%	0.00%	0.00%
<i>Methylobacterium indicum</i>	7.43%	0.00%	3.91%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.14%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.62%	2.83%
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	0.18%	0.03%	16.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.14%	0.00%	0.00%
<i>Pseudoxanthomonas icgebensis</i>	0.00%	0.00%	1.24%	0.00%	0.00%	2.23%	5.36%	0.00%	3.38%	0.00%	2.37%	0.07%	0.87%	0.00%
<i>Microbacterium testaceum</i>	0.60%	0.00%	2.19%	0.53%	7.73%	0.40%	0.22%	1.32%	0.00%	1.55%	0.58%	1.51%	0.38%	0.51%
<i>Aureimonas ureilytica</i>	1.69%	0.00%	3.41%	2.14%	1.50%	0.00%	0.45%	0.73%	0.27%	1.64%	0.00%	0.54%	1.20%	0.28%
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	2.22%	0.50%	0.00%	2.72%	0.00%	1.29%	1.07%	1.03%	0.38%	2.08%	0.48%	0.39%	0.00%	0.54%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.80%	1.86%	0.30%	0.88%	0.00%	0.00%	5.64%	0.00%	0.85%	1.07%	0.62%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	1.15%	0.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.94%	0.00%	0.23%	0.33%	0.00%	2.42%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Acidovorax avenae</i>	0.33%	0.21%	0.77%	0.00%	1.47%	0.21%	0.28%	0.00%	0.00%	0.42%	0.00%	0.08%	0.04%	0.30%
<i>Saccharibacillus endophyticus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.03%	2.36%	0.04%	0.00%	0.01%	0.00%	0.04%	0.00%
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	0.00%	0.00%	0.43%	0.47%	1.34%	0.00%	0.35%	0.00%	0.11%	0.00%	0.08%	0.00%	0.00%	0.16%
<i>Cronobacter sakazakii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	1.25%	0.38%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.00%

왕겨 세균 군집 species 분포 (% ratio)

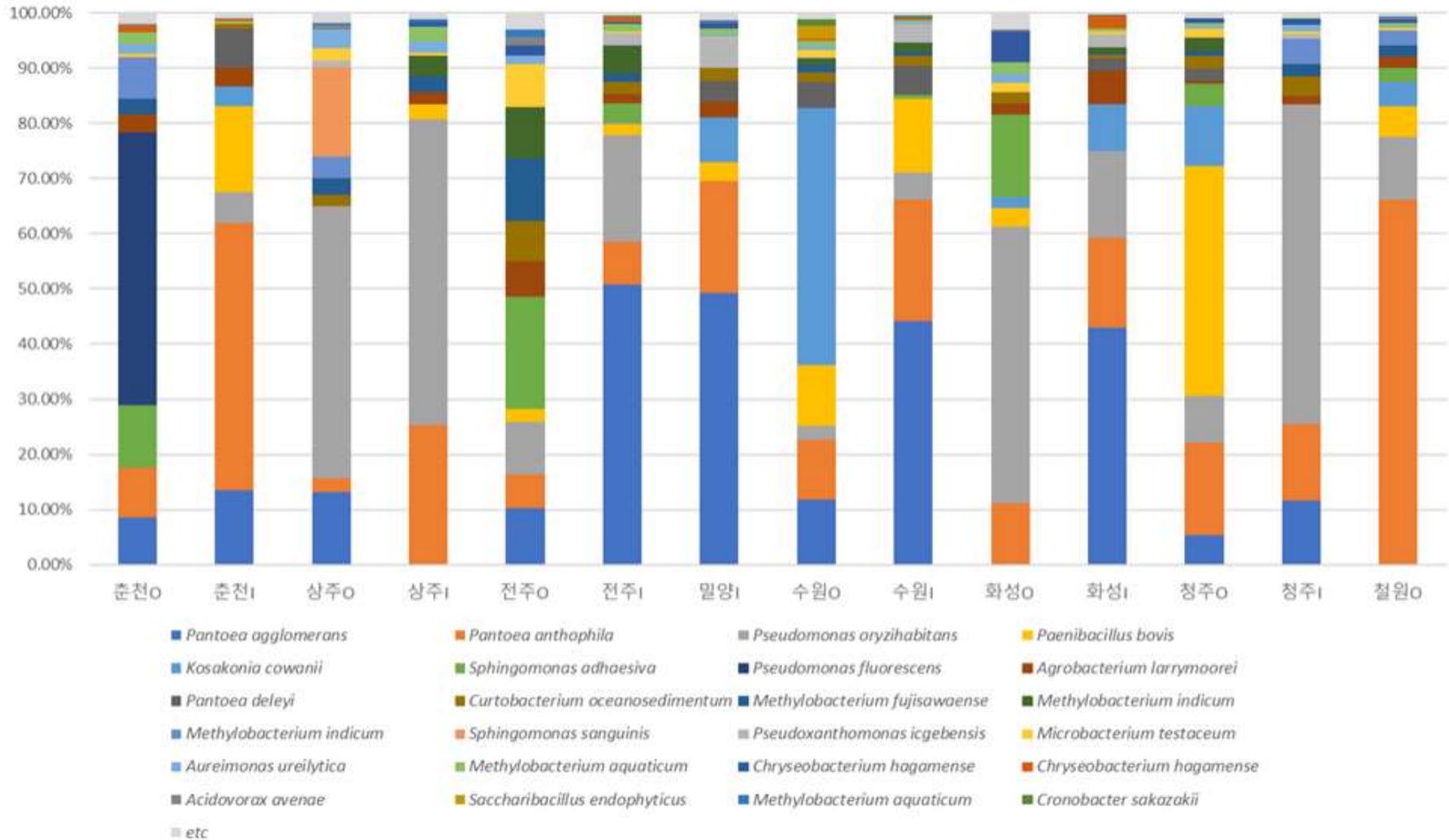


그림 166. 벼 왕겨내의 세균 species 분포도 (% ratio)

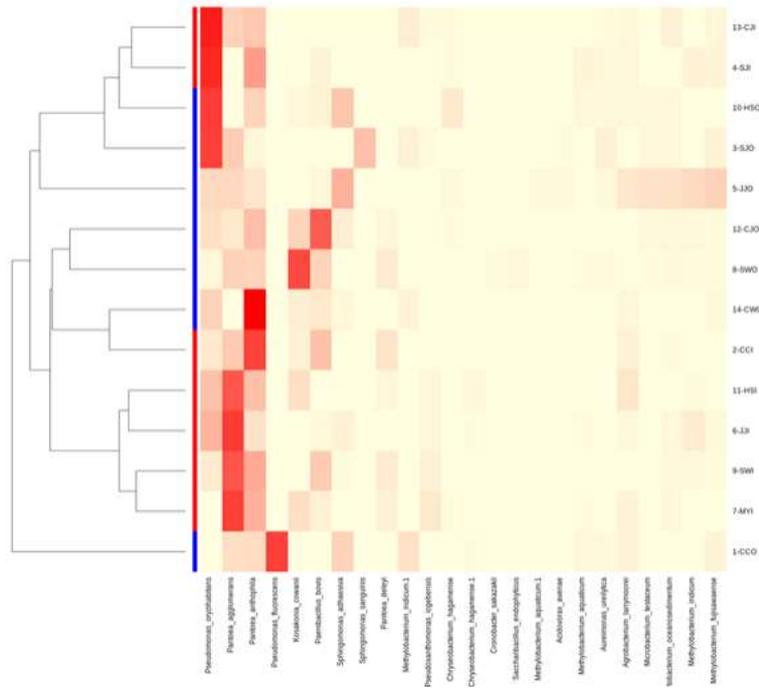


그림 167. 벼 왕겨 세균 군집의 종 (species) 수준에서의 heatmap 분석

표 111과 그림 168는 왕겨내의 세균 군집을 속 (genus) 수준에서 비교분석한 것으로 대다수의 시료에서 *Pantoea*와 *Pseudomonas* 속에 속하는 세균들이 일정한 비율로 과점하고 있음을 보여 준다.

표 112. 벼 왕겨내의 세균 genus 분포표 (% ratio)

sample	춘천O	춘천I	상주O	상주I	전주O	전주I	밀양	수원O	수원I	화성O	화성I	청주O	청주I	철원O
<i>Pantoea</i>	17.50%	69.00%	15.70%	25.30%	16.40%	58.60%	73.40%	27.60%	71.30%	11.20%	61.30%	24.50%	25.60%	66.10%
<i>Pseudomonas</i>	49.40%	5.98%	49.30%	55.40%	9.49%	19.30%	0.00%	2.45%	4.93%	50.20%	15.90%	8.40%	57.80%	11.40%
<i>Paenibacillus</i>	0.01%	15.50%	0.00%	2.78%	2.35%	1.96%	3.33%	11.00%	13.40%	3.36%	0.00%	41.80%	0.01%	5.66%
<i>Kosakonia</i>	0.00%	3.53%	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	8.12%	46.60%	0.00%	2.14%	8.45%	10.80%	0.00%	4.31%
<i>Methylobacterium</i>	13.00%	0.50%	7.40%	10.60%	22.90%	7.96%	1.42%	3.74%	3.13%	2.71%	1.99%	3.69%	6.99%	5.50%
<i>Sphingomonas</i>	11.90%	0.12%	16.50%	0.00%	20.70%	3.63%	0.01%	0.00%	0.72%	15.30%	0.05%	4.26%	0.00%	2.83%
<i>Agrobacterium</i>	3.18%	3.44%	0.03%	2.16%	6.37%	1.75%	2.84%	0.00%	0.01%	2.15%	6.08%	0.54%	1.47%	2.06%
<i>Curtobacterium</i>	0.00%	0.85%	2.05%	0.00%	7.36%	2.17%	2.45%	1.67%	1.83%	2.08%	0.65%	2.37%	3.65%	0.00%
<i>Chryseobacterium</i>	1.43%	0.34%	0.72%	0.82%	2.90%	1.31%	0.99%	0.32%	0.37%	6.86%	2.42%	1.05%	1.07%	0.66%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.00%	0.00%	1.24%	0.00%	0.00%	2.23%	5.36%	0.00%	3.38%	0.00%	2.37%	0.07%	0.87%	0.00%
<i>Microbacterium</i>	0.62%	0.02%	2.20%	0.53%	7.76%	0.42%	0.22%	1.36%	0.00%	1.57%	0.63%	1.51%	0.39%	0.51%
<i>Aureimonas</i>	1.69%	0.00%	3.41%	2.14%	1.50%	0.00%	0.45%	0.73%	0.27%	1.64%	0.00%	0.54%	1.20%	0.28%
<i>Acidovorax</i>	0.33%	0.21%	0.77%	0.00%	1.47%	0.21%	0.28%	0.00%	0.00%	0.42%	0.00%	0.08%	0.04%	0.30%
<i>Saccharibacillus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.03%	2.61%	0.04%	0.00%	0.01%	0.14%	0.04%	0.00%
<i>Cronobacter</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.11%	1.25%	0.38%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.00%

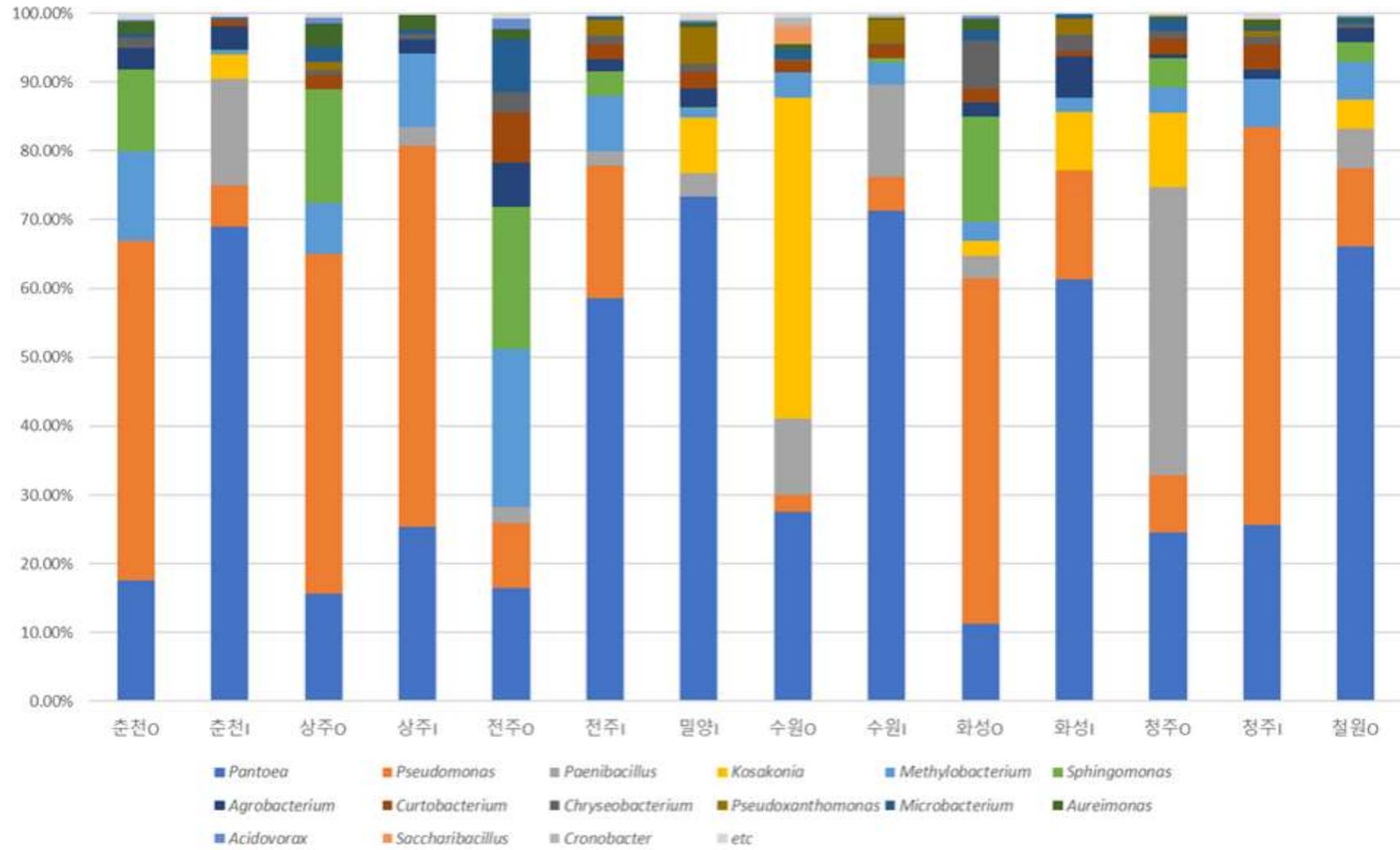


그림 168. 벼 왕겨내의 세균 군집 genus 분포 (% ratio)

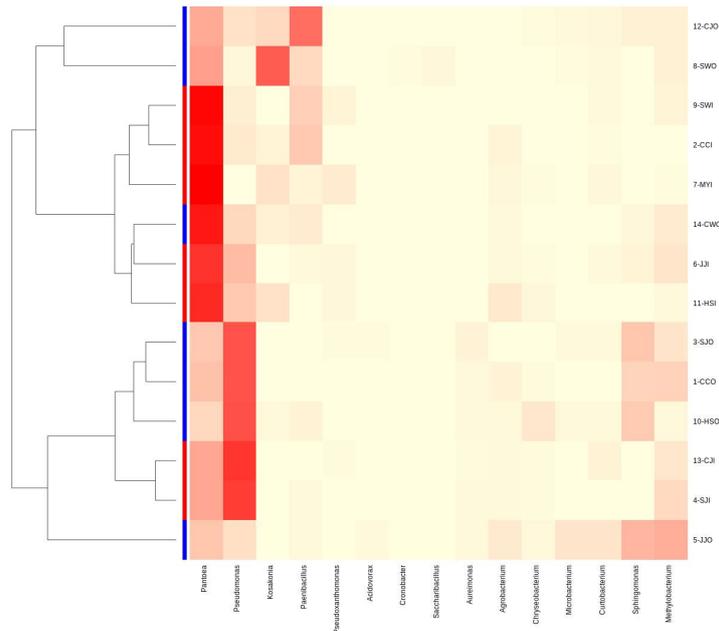


그림 169. 벼 왕겨 세균 군집의 속 (genus) 수준에서의 heatmap 분석

그림 169는 벼 왕겨내 세균군집을 속 (genus) 수준에서 heatmap 분석한 것으로 *Pantoea*가 과점하는 시료, *Pseudomonas*가 과점하는 시료, 기타 다른 종들이 과점하는 시료로 나뉘어짐을 알 수 있지만, 어떤 기준으로 나뉘어지는지는 알 수 없다.



그림 170. 벼 왕겨내 세균군집의 계통분류학 수준의 상대적 비율분포 차트

MetaCoMET을 이용한 벼 왕겨내 세균군집의 계통분류학 비율분포 차트 (그림 171)을 보면, *Pseudomonas oryzae*, *Pantoea anthophila*, *Pantoea agglomerans*가 20% 내외로 엇비슷한 비율을 보이고 *Paenibacillus bovis*, *Kosakonia cowanii* 등도 꽤 높은 비율을 보이는데, 이는 과점하는 세균 외에 소수의 세균들이 비교적 균등하게 존재하는 것을 의미한다.

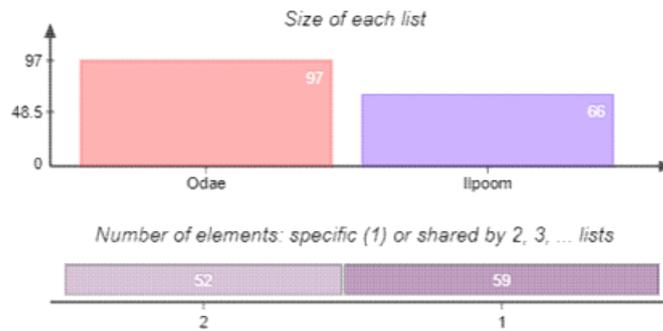
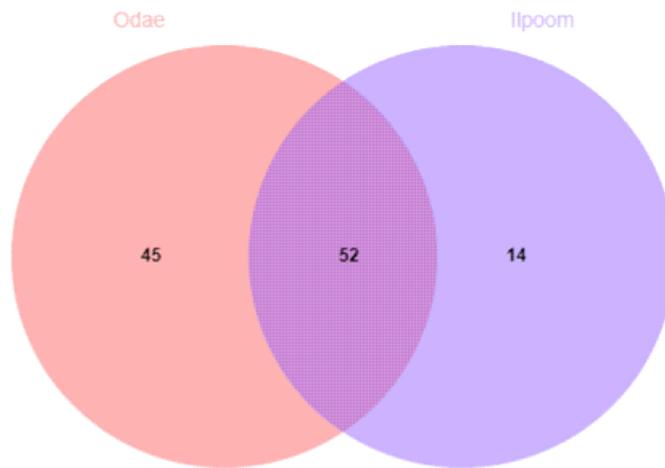


그림 171. 벼 왕겨내 세균군집의 Venn diagram

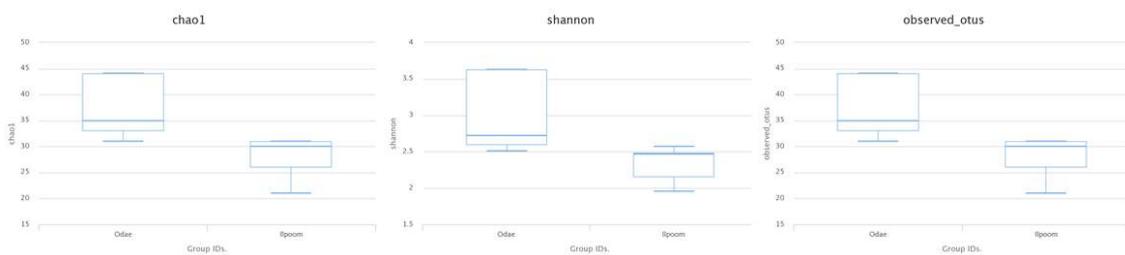


그림 172. 벼 왕겨내 세균군집의 alpha diversity 분석

오대벼와 일품벼 그룹간의 세균 군집 다양성을 비교해보면 각각 97종과 66종으로 오대벼가 좀더 다양한 세균군집이 존재하고 이는 chao1 index나 shannon index에서도 그대로 보여준다 (그림 171, 172). 이는 오대벼 시료에 좀 더 다양한 종이 세균군집이 존재할 가능성이 높음을 의미한다.

② 진균 ITS 미생물 군집 분석

왕겨, 현미, 백미 모두 도정과정에서 벼의 조직에 상처를 낸 시료들이라 예전 프라이머 세트를 사용했으면 벼 ITS의 과증폭이 될 가능성이 높았지만, 백미를 제외하고 벼의 ITS에서 유래한 OTU가 확인되지 않았고 raw reads대비 align된 reads수의 비율이 대부분 높은 것으로 보아 새로 사용한 fungi-specific primer set가 효과적이었음을 입증하였다. 또한, 대부분의 시료에서 벼의 ITS 유래 OTU와 align된 reads가 발견된 백미 조직의 경우에도 진균군집에서 유래한 reads 수가 6만개 이상으로 분석에는 아무런 지장이 없었다.

한편 군집들간의 OTU수를 비교분석해보면, 왕겨는 100개 내외의 상대적으로 많은 OTU를 가지는 반면, 현미와 백미는 헤이룽장성에서 생산된 시료를 제외한 모든 시료가 10개 미만의 극단적으로 적은 OTU를 가지는데, 특히 현미에서는 2개의 시료를 제외한 12개의 시료에서 4개 이하의 극단적으로 적은 OTU만 가지는 것으로 분석되었다 (표 113).

표 113. Lotus pipeline로 분석한 왕겨, 현미, 백미 시료들의 진균 ITS metagenome 요약

type	SampleID	SampleName	Raw	OTU_num	OTU_host	OTU_reads	Host_read	OTU_filter	Reads_filtered	%aligned
왕겨	1-CCO	춘천O	141,247	91	0	104,744	-	91	104,744	74.16%
왕겨	2-CCI	춘천I	151,221	91	0	112,563	-	91	112,563	74.44%
왕겨	3-SJO	상주O	134,481	129	0	98,182	-	129	98,182	73.01%
왕겨	4-SJI	상주I	132,524	94	0	97,731	-	94	97,731	73.75%
왕겨	5-JJO	전주O	133,342	64	0	92,915	-	64	92,915	69.68%
왕겨	6-JJI	전주I	120,224	88	0	91,053	-	88	91,053	75.74%
왕겨	7-MYI	밀양I	123,900	109	0	93,032	-	109	93,032	75.09%
왕겨	8-SWO	수원O	152,280	87	0	111,077	-	87	111,077	72.94%
왕겨	9-SWI	수원I	139,352	68	0	104,482	-	68	104,482	74.98%
왕겨	10-HSO	화성O	146,668	69	0	82,471	-	69	82,471	56.23%
왕겨	11-HSI	화성I	147,702	105	0	108,468	-	105	108,468	73.44%
왕겨	12-CJO	청주O	129,443	58	0	95,710	-	58	95,710	73.94%
왕겨	13-CJI	청주I	159,980	107	0	116,641	-	107	116,641	72.91%
왕겨	14-CWO	철원O	145,301	69	0	111,316	-	69	111,316	76.61%
현미	CCO-2	춘천2	197,598	2	0	117,008	-	2	117,008	59.22%
현미	HSO-2	화성2	148,305	2	0	76,893	-	2	76,893	51.85%
현미	SWO-2	수원2	162,004	1	0	90,049	-	1	90,049	55.58%
현미	CJO-2	청주2	165,481	1	0	70,090	-	1	70,090	42.36%
현미	JJO-2	전주2	189,258	4	0	126,697	-	4	126,697	66.94%
현미	SJO-2	상주2	196,373	1	0	126,393	-	1	126,393	64.36%
현미	HLH-2	헤이룽장2	227,862	15	0	130,171	-	15	130,171	57.13%
현미	LOH-2	랴오닝2	187,000	3	0	90,861	-	3	90,861	48.59%
현미	SXC-2	산시2	205,990	2	0	105,582	-	2	105,582	51.26%
현미	SDT-2	산둥2	217,088	2	0	51,197	-	2	51,197	23.58%
현미	HNX-2	허난2	226,419	1	0	96,671	-	1	96,671	42.70%
현미	SCN-2	쓰촨2	233,046	3	0	145,381	-	3	145,381	62.38%
현미	HUH-2	후베이2	173,391	8	0	83,867	-	8	83,867	48.37%
현미	JST-2	장쑤2	236,054	2	0	91,598	-	2	91,598	38.80%
백미	CCO-3	춘천3	169,385	8	1	107,040	21,854	7	85,186	50.29%
백미	HSO-3	화성3	206,119	10	1	133,198	32,839	9	100,359	48.69%
백미	JJO-3	전주3	142,573	7	1	85,084	16,740	6	68,344	47.94%
백미	HLH-3	헤이룽장3	167,976	12	1	93,701	17,733	11	75,968	45.23%
백미	LOH-3	랴오닝3	230,801	8	1	70,408	2,737	7	67,671	29.32%
백미	HNX-3	허난3	194,684	1	0	68,952	-	1	68,952	35.42%

표 114-1. 왕겨 시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	왕겨													
	1-CCO 춘천O	2-CCI 춘천I	3-SJO 상주O	4-SJI 상주I	5-JJO 전주O	6-JJI 전주I	7-MYI 밀양I	8-SWO 수원O	9-SWI 수원I	10-HSO 화성O	11-HSI 화성I	12-CJO 청주O	13-CJI 청주I	14-CWO 철원O
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	71.80%	51.30%	60.20%	78.90%	82.30%	78.70%	75.00%	51.80%	66.80%	50.50%	61.60%	89.70%	74.80%	76.70%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.02%	0.00%	0.15%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium welwitschiiicola</i>	4.46%	5.07%	16.60%	5.83%	4.35%	4.09%	6.14%	7.30%	3.68%	24.80%	7.20%	1.78%	8.94%	7.54%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	1.21%	0.03%	4.58%	0.08%	0.64%	0.11%	0.05%	1.69%	0.17%	0.85%	0.14%	0.23%	0.42%	0.05%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.02%	0.00%	0.04%	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Sakaguchia cladiensis</i>	5.47%	22.90%	0.41%	2.53%	0.68%	0.36%	0.28%	0.63%	15.10%	0.05%	8.91%	0.00%	0.32%	0.00%
<i>Fusarium pseudoarcatum</i>	4.77%	1.21%	0.23%	0.47%	5.27%	1.06%	0.90%	2.10%	0.26%	13.20%	0.30%	0.59%	1.64%	1.68%
<i>Epicoccum poae</i>	0.92%	0.09%	0.57%	0.24%	0.00%	0.00%	0.01%	0.09%	0.03%	0.28%	0.06%	0.02%	0.13%	0.89%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum vitios</i>	2.84%	1.96%	7.24%	2.11%	2.01%	2.24%	3.43%	1.89%	1.03%	0.89%	0.00%	2.90%	0.22%	0.30%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.25%	0.20%	1.43%	0.31%	0.09%	0.83%	0.05%	6.75%	0.01%	1.15%	0.00%	1.37%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	0.00%	0.09%	1.22%	0.07%	0.00%	0.03%	0.06%	0.11%	0.18%	0.30%
<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	0.88%	6.36%	0.30%	0.71%	0.16%	0.25%	0.61%	1.02%	0.20%	0.19%	0.82%	0.07%	0.54%	7.89%
<i>unclassified Ascomycota</i>	0.02%	0.00%	0.03%	0.04%	0.13%	0.07%	0.06%	0.01%	0.00%	0.22%	0.13%	0.00%	0.04%	0.31%
<i>Wallemia canadensis</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Ascomycota2</i>	0.01%	0.02%	0.12%	0.10%	0.05%	0.09%	0.05%	16.30%	0.13%	0.38%	0.12%	0.01%	0.00%	0.31%
<i>Nigrospora pyriformis</i>	0.06%	0.07%	1.03%	0.53%	0.29%	0.18%	0.06%	1.46%	0.06%	0.00%	0.16%	0.03%	0.15%	0.51%
<i>Penicillium atrovirens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Basidiomycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.24%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Symmetrospora coprosmae</i>	0.04%	0.00%	0.00%	0.23%	0.05%	0.56%	0.30%	0.06%	3.59%	0.00%	2.05%	0.06%	3.04%	0.08%
<i>Curvularia soli</i>	0.05%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.15%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Phaeosphaeria oryzae</i>	0.01%	0.03%	0.24%	0.02%	0.09%	0.10%	0.18%	0.24%	0.05%	0.13%	0.00%	0.02%	0.08%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhodotorula alborubescens</i>	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Papiliotrema japonica</i>	0.23%	3.75%	0.00%	0.07%	0.00%	0.03%	0.09%	0.00%	0.43%	0.00%	0.04%	0.00%	0.22%	0.23%
<i>unclassified Pleosporaceae</i>	0.09%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Dothideomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Aspergillaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

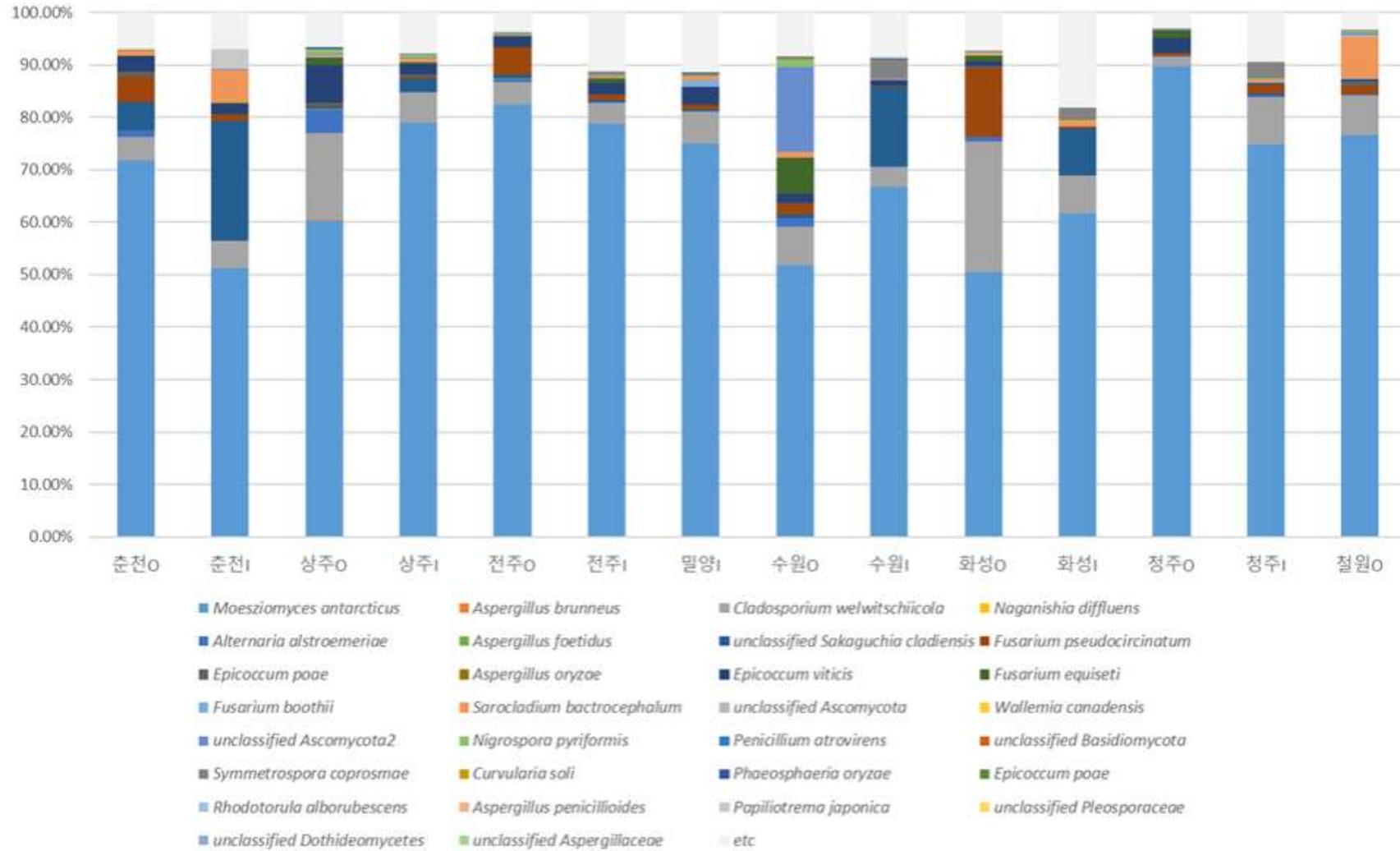


그림 173-1. 왕겨내의 진균 군집 중 (species) 분포 (% ratio)

표 114-2. 현미 시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	현미													
	CCO-2	H5O-2	SWO-2	CJO-2	JJO-2	SJO-2	HLH-2	LOH-2	SXC-2	SDT-2	HNX-2	SCN-2	HUH-2	JST-2
	춘천2	화성2	수원2	청주2	전주2	상주2	헤이릉장2	라오닝2	산시2	산릉2	허난2	쓰촨2	후베이2	장쑤2
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	77.50%	97.70%	100.00%	100.00%	91.00%	100.00%	20.70%	86.80%	5.55%	0.00%	0.00%	5.01%	76.30%	0.00%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	88.40%	100.00%	0.00%	0.00%	83.40%
<i>Cladosporium welwitschiiicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.69%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.36%	0.00%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	94.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.00%	2.34%	0.00%	0.00%	5.20%	0.00%	2.23%	10.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.28%	0.00%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	55.60%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Sakaguchia cladiensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.28%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium pseudoaricatum</i>	22.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.38%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	9.40%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum vitidis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	18.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.17%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.62%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Ascomycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.44%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Wallemia canadensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	13.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Ascomycota2</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Nigrospora pyriformis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium atrovirens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.43%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	16.60%
<i>unclassified Basidiomycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	9.56%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Symmetrospora coprosmae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Curvularia soli</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Phaeosphaeria oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.75%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	6.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhodotorula alborubescens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	11.60%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Papiliotrema japonica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Pleosporaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Dothideomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.16%	0.00%
<i>unclassified Aspergillaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

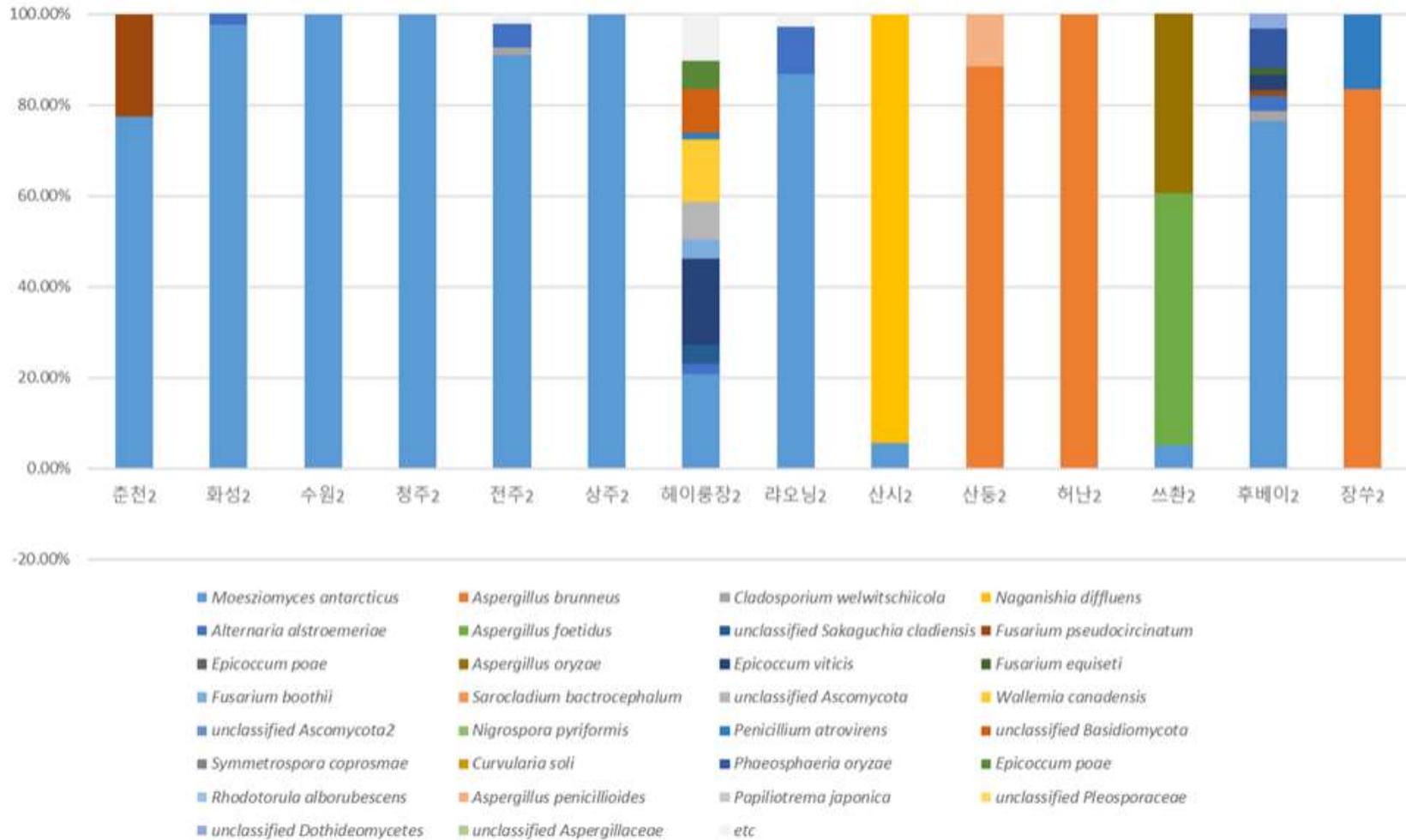


그림 173-2. 현미내의 진균 군집 종 (species) 분포 (% ratio)

표 114-3. 백미 시료들의 진균군집 species 분포 (%ratio)

	백미					
	CCO-3	HSO-3	JJO-3	HLH-3	LOH-3	HNX-3
	춘천3	화성3	전주3	헤이룽장3	랴오닝3	허난3
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	32.50%	18.60%	45.30%	4.03%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	21.50%	76.20%	100.00%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	5.91%	3.95%	2.74%	2.24%	0.00%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	29.10%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	8.65%	13.20%	42.60%	4.61%	10.10%	0.00%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Sakaguchia cladiensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0.00%	6.06%	0.00%	0.00%	2.32%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	14.30%	29.30%	0.00%	18.80%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum vitidis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	13.70%	2.02%	0.00%	0.00%	2.88%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	15.80%	2.76%	4.40%	0.00%	0.00%
<i>Sarodadium bactrocephalum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Ascomycota</i>	0.00%	6.81%	0.00%	1.83%	0.00%	0.00%
<i>Wallemia canadensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.57%	0.00%
<i>unclassified Ascomycota2</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Nigrospora pyriformis</i>	14.40%	0.00%	3.41%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Penicillium atrovirens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Basidiomycota</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Symmetrospora coprosmae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Curvularia soli</i>	11.80%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Phaeosphaeria oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Rhodotorula alborubescens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	9.70%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Papiliotrema japonica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Pleosporaceae</i>	4.68%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Dothideomycetes</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>unclassified Aspergillaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.73%	0.00%

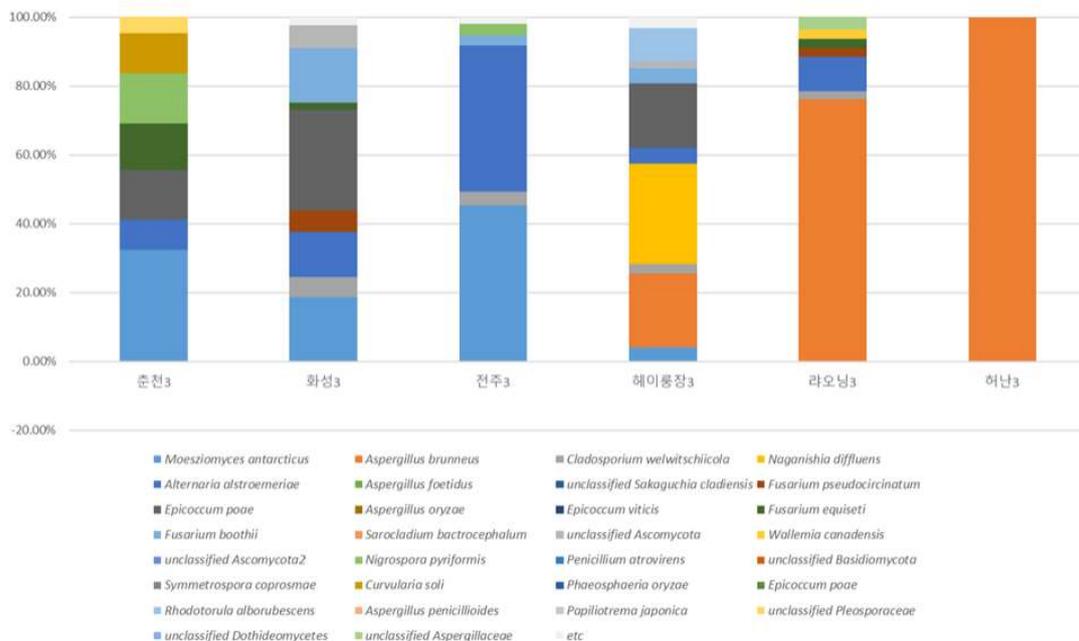


그림 173-3. 백미내의 진균 군집 종 (species) 분포 (% ratio)

왕겨, 현미, 백미간의 진균 군집분포의 차이와 국내산과 중국산의 차이는 종 (species) 수준에서도 확연한데, 모든 시료가 국내산인 왕겨에선 *Moesziomyces antarcticus*가 50~90%의 압도적인 비율로 과점하고 있고, 국내산 현미는 이런 현상이 더 극대화되어 춘천을 제외한 나머지 시료들은 90% 이상 100%에 가까운 압도적인 비율을 보이고, 춘천도 77.5%의 매우 높은 비율을 보였다. 중국산 현미는 랴오닝성과 후베이성의 시료만 *M. antarcticus*가 86.8%와 76.3%로 과점하고 있고 산둥, 허난, 장쑤성의 시료들은 *Aspergillus brunneus*가 80% 이상 100%까지 과점하였으며, 산시성의 시료는 *Naganishia diffluens*가 94.4%로 과점하는 현상을 보였다. 한편, 쓰촨성의 시료는 *Aspergillus foetidus*와 *Aspergillus oryzae*가 55.6%와 39.4%로 양분하고 있었고, 헤이룽장성 시료는 *M. antarcticus*, *Epicoccum viticis* 등 여러 종의 곰팡이들이 군집을 형성하는 것으로 발견되었다. 한편 국내산 백미시료에서의 *M. antarcticus* 비율이 18.6~45.3%로 현격히 낮아지고 다른 균들의 비율이 높아지는 현상을 보였고, 중국산 백미 중 랴오닝성과 허난성의 시료들은 *A. brunneus*가 76.2%와 100%로 매우 높은 비율을 보였다. 이중 허난성의 시료는 현미와 백미 모두 *A. brunneus*만 100% 존재하는 반면, 랴오닝성의 시료는 현미에선 *M. antarcticus*가 86.8%로 과점하는 반면, 백미에선 *A. brunneus*가 76.2%로 과점하는 상이한 결과를 보였다. 헤이룽장성의 백미는 현미와 마찬가지로 다양한 곰팡이들이 존재하는 데, *M. antarcticus*와 *Epicoccum viticis*가 20.7%와 18.9%를 보인 현미와 달리 *Naganishia diffluens*와 *A. brunneus*가 29.1%와 21.5%로 서로 다른 곰팡이들이 과점하는 현상을 보이는데, 이는 랴오닝성의 현미와 백미의 구조와 유사하다.

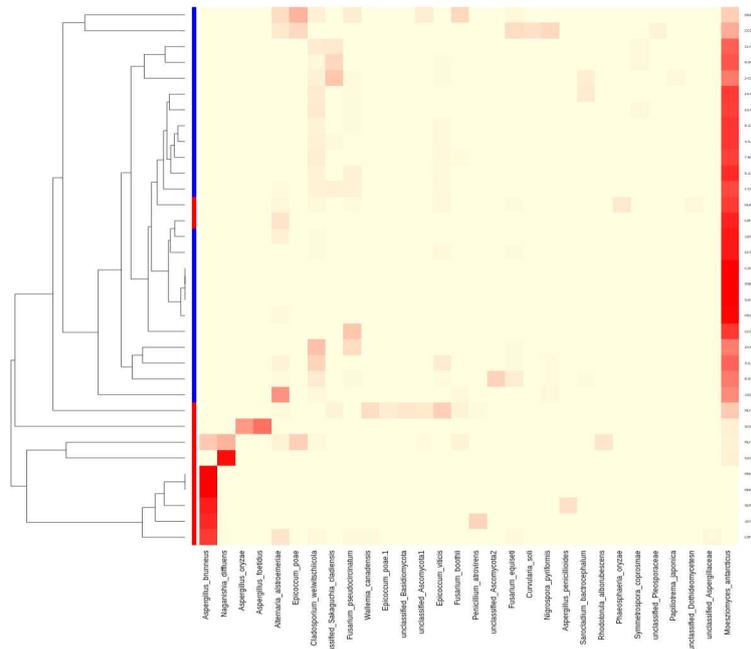


그림 174. 벼 진균 군집의 종 (species) 수준에서의 heatmap 분석

진균 군집을 종 (species) 수준에서 heatmap 분석 (그림 174)한 것은 이런 특징을 한꺼번에 보여주는데, 대부분의 시료에서 *M. antarcticus*가 우점을 차지하는 국내산 시료들과 *A. brunneus*, *N. diffluens* 등이 과점하는 중국산 시료들로 대부분 분류된다. 벼 종자내의 진균군집은 소수의 진균이 과점하기 때문에 이런 현상은 속 (genus) 수준에서 분석해도 크게 다르지 않는데, 그 요약은 그림 175의 heatmap과 같다.

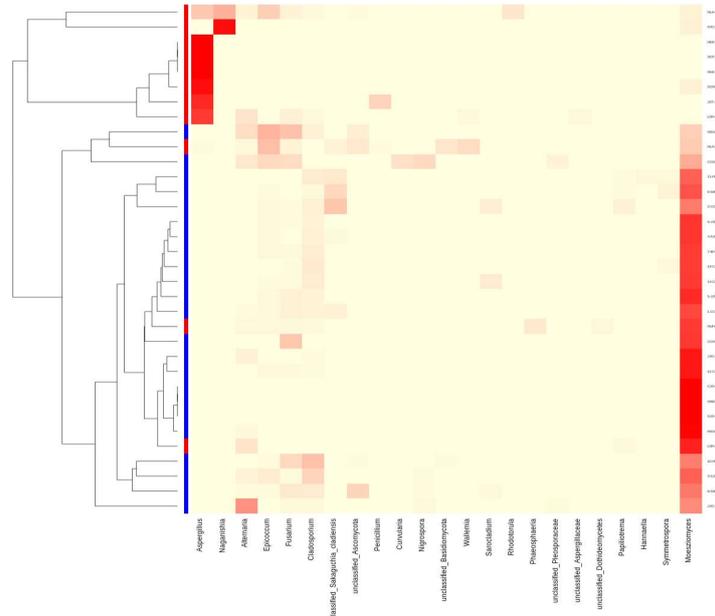


그림 175. 벼 진균 군집의 속 (genus) 수준에서의 heatmap 분석

MetaCoMET을 이용해 만든 왕겨, 현미, 백미에 존재하는 진균군집을 계통분류학 수준의 비율 분포 차트가 그림 176인데, 예상대로 *M. antarcticus*가 54%로 과점하면서 *A. brunneus*도 14%로 높게 존재함을 알 수 있다.

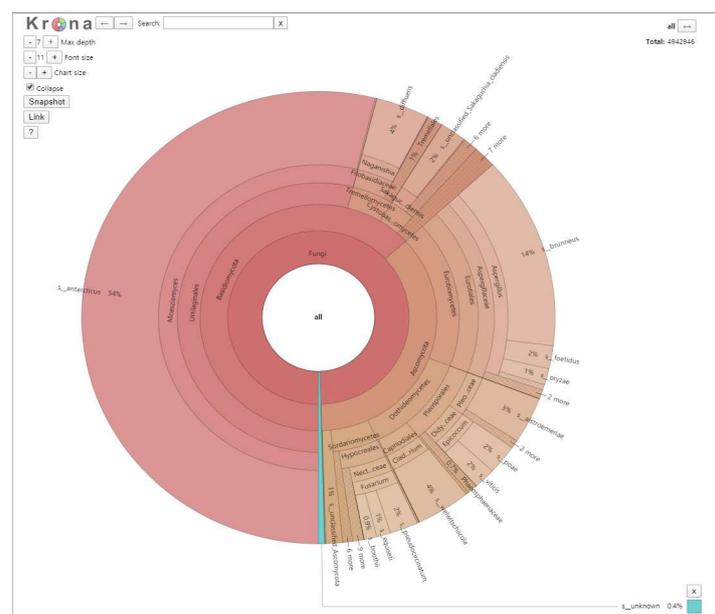


그림 176. 벼종자 진균군집의 계통분류학 수준의 상대적 비율분포 차트

그림 177과 그림 178는 MetaCoMET을 이용하여 얻은 국내산과 중국산 시료들간의 밴다이어그램과 alpha diversity 분석차트들인데, 국내산 왕겨 (chaff)에서 특이적으로 발견된 428종 중 4개만 하나의 시료에서 3% 이상이 높은 비율로 존재하는 종이었고 나머지는 그 이하로 희귀하게 존재하는 종들임을 나타낸다. 또한, 국내산 현미 (BrownK)와 국내산 백미 (WhiteK), 중국산 백미 (WhiteC)에 특이적으로 존재하는 균이 거의 없는 반면 중국산 현미에서는 4종이나 특이적으로 존재하고 이중 3종이 3% 이상의 높은 비율로 존재하는 종이였다. 종에 대한 richness를 나타내는 지표인 chao1 index에서 종의 다양성을 추정하는 지표인 shannon index는 왕겨에서 높다가 현미에서 낮아진 지표가 백미에서는 다시 높아지는 현상을 보인다.

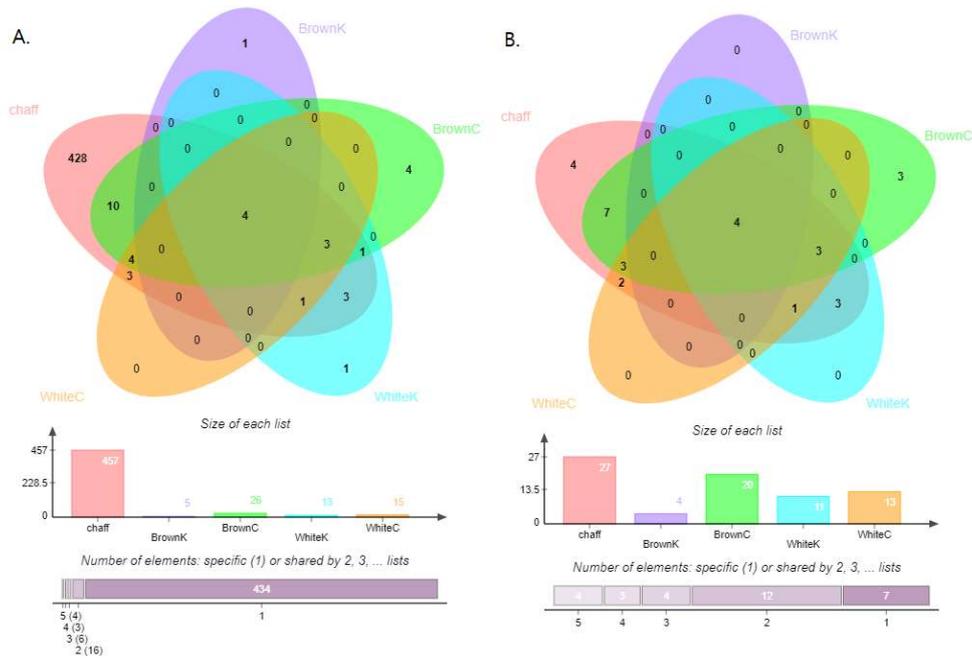


그림 177. 국내외 벼 왕겨, 현미, 백미들간의 진균군집 Venn diagram

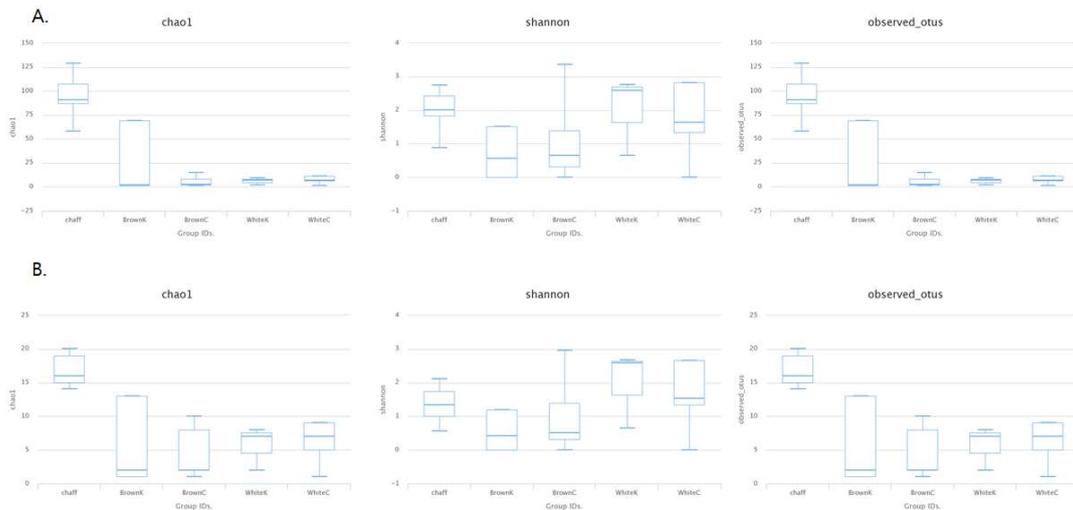


그림 178. 벼 진균군집의 alpha diversity 분석:
(A) 모든 OTU, (B) 하나 이상의 시료에서 % 이상 발현된 OTU

국내산왕겨, 국내산현미, 중국산현미, 국내산백미, 중국산백미간의 주좌표분석 (Principal coordinate analysis, PCoA)에서 국내산왕겨와 현미가 매우 밀접히 연관된 반면, 다른 그룹들은 이들에게서 상당히 멀리 떨어져 있는데, 이것은 *M. antarcticus* 등 시료를 과점하는 시료들과 연관이 높다 (그림 179).

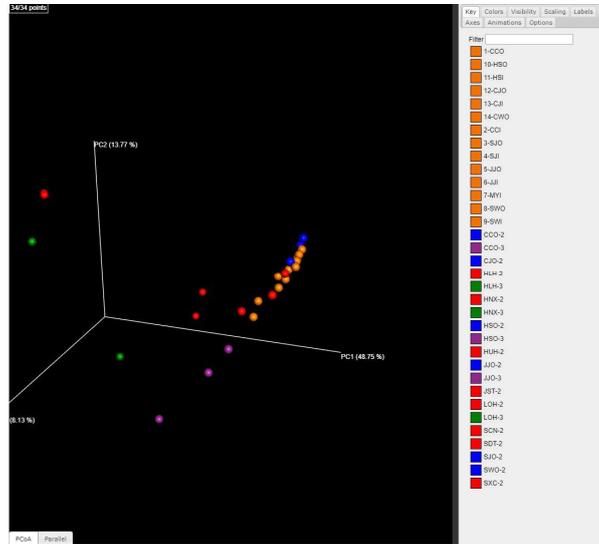


그림 179. 벼 진균 군집들간의 Principal coordinate analysis (PCoA) plot
국내산 왕겨 (주황색), 국내산 현미 (파랑색), 중국산 현미 (적색), 국내산 백미 (갈색), 중국산 백미 (녹색)

벼의 낱알은 겉껍질이 주인 왕겨와 과피, 종피, 호분층 등 미강 (쌀겨)으로 보호되는데, 현미에는 이 미강과 쌀눈이 살아있게 도정한 쌀이고 백미는 이것을 제거하고 배유만 남아있는 쌀이다. 같은 지역의 시료에서 왕겨, 현미, 백미를 모두 분석한 국내산을 기준으로 벼 종자주변의 진균군집분포를 보면, 미강층에는 *M. antarcticus*가 100%에 가까운 비율을 보이는데, *Moesziomyces* (구. *Pseudozyma*) 속에 속하는 균들은 숙주의 표면에 부착되는 착생균 (epiphytic fungus)으로 병원성 세균이나 진균들을 억제하기위한 biocontrol agents로 효과적이라는 것이 보고되어 있다. (<https://www.science.gov/topicpages/b/biocontrol+agent+pseudozyma>)

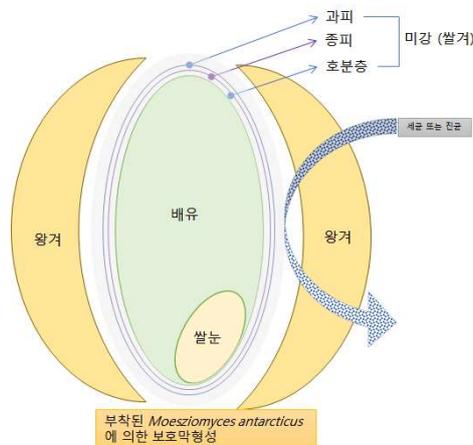


그림 180. 벼 종자 및 *Moesziomyces antarcticus*에 의한 외부 균류 방어 모식도

이런 특성과 왕겨에서만 발견된 428종의 진균군집 (이중 424종이 희소한 비율로 존재)을 토대로 유추해보면, 왕겨에 보호되거나 도정한지 얼마안된 건강한 현미에서는 *M. antarcticus*가 백백이 부착하여 다른 진균(또는 세균)들이 미강층 안쪽으로 침투하는 것을 막는 천연 보호막 역할을 하는 것으로 추정되고 이에따라 왕겨에서만 유독 높게 발견된 400종 이상의 진균군집은 미강층으로 침투하지 못하고 왕겨쪽에 희소한 비율로 부유하는 것들로 추정된다. 한편, 국내산 백미에서는 *M. antarcticus*의 비율이 현저히 낮아지고 다른 진균들이 소수 보이기 시작하는데, 이는 도정과정에서 미강층의 *M. antarcticus* 보호막이 파괴되면서 다른 균들이 침투하기 시작해서 생긴 것으로 보인다.

한편, 중국산 현미 중에 스트레스에 강한 균주들로 보고된 *A. bruneus*나 *N. diffluens*가 과점하는 시료들이 8개 중 4개나 되는데, 이는 *M. antarcticus*와 다른 기작으로 벼의 미강층을 보호하거나 도정 이후 보관, 운송과정중에 *M. antarcticus*의 보호층이 파괴된 후에 건조 등 스트레스에 대한 보호기작으로 새로 형성된 착생균층으로 보이는데, 이를 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 다만, *M. antarcticus*의 비율이 현격히 낮아진 국내산 백미와 달리 중국산 백미에선 *A. bruneus*의 비율이 여전히 건재한 것으로 보아 나중에 새로 형성된 균층일 확률이 좀 더 높아 보인다.

(5) 농산물 별 메타지놈 시퀀스 생산 및 미생물 군집 분석 종합

(가) 16S rRNA metagenome sequencing을 통한 세균 군집 분석결과 요약

16S rRNA metagenome 분석을 통해서 대두, 참깨, 벼의 왕겨에서 분석한 세균군집들의 분포는 표 115, 116, 117과 같은데, 세 작물모두 *Pantoea* 속 미생물과 *Pseudomonas* 속 미생물이 가장 많이 검출되는 점은 공통점이 발견되었는데, 종 수준에서 보면 서로 상이하고 심지어 시료들 간의 차이도 크다.

Pantoea 속 미생물만 보면, 국내산 대두는 *P. vagans*가 91.4%로 과점하는 상태이고 참깨는 시료에 따라서 *P. eucrina*, *P. wallisii*, *P. dispersa* 등 과점하는 종이 다르다. *Pseudomonas* 속 미생물의 경우, 대두는 *P. coleopterorum*이 가장 많이 검출된 반면, 참깨와 벼는 *P. oryzihabitans*가 가장 많이 검출되었는데, 일부 벼에서는 *P. fluorescens*가 과점하기도 했다. 이들 두 미생물들이 토양 등에 흔한 세균인데다가 식물 등과 공생관계를 유지하는 경우가 많아서 그런 것으로 보이는데, 시료마다 우점종들이 변화가 심한 것은 주변 환경 등 여러 요인에 의해 우점종이 수시로 변해서로 추정된다. 이는 종 (species) 수준에서의 판별마커 개발이 어렵고 예외적인 경우도 많이 나올 수 있음을 시사한다.

표 115. 대두 16S metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 세균군집 분포

종 raw			종 %ratio		
Species	한국산	중국산	Species	한국산	중국산
<i>Pantoea vagans</i>	57,283	-	<i>Pantoea vagans</i>	91.40%	0.00%
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	3,379	113	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	5.39%	14.60%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	1,273	-	<i>Pseudomonas cichorii</i>	2.03%	0.00%
<i>Erwinia rhapontici</i>	115	189	<i>Erwinia rhapontici</i>	0.18%	4.50%
<i>Rhodoligotrophos appendicifer</i>	-	128	<i>Rhodoligotrophos appendicifer</i>	0.00%	16.60%

표 116. 참깨 16S metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 세균군집 분포

한국산 (1)	K_JB1	K_JB2	K_JB3	K_JN1	K_JN2	K_JN3	K_JN4	K_GB1	K_GB2	K_GB3	K_GN1	K_GN2	K_GN3
<i>Pantoea eucrina</i>	90.10%	70.00%	65.14%	56.70%	0.02%	65.94%	0.27%	63.40%	0.01%	42.70%	85.10%	59.00%	1.70%
<i>Pseudomonas oryziphobans</i>	0.19%	0.00%	17.70%	0.47%	33.60%	0.00%	13.50%	20.00%	19.90%	22.00%	0.14%	24.60%	0.57%
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.18%	57.50%	0.00%	0.00%	0.00%	73.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	71.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Bacillus wiedmannii</i>	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.00%	0.21%	0.02%	0.00%	5.77%	0.10%	5.42%	0.80%	0.03%	0.04%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	66.84%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.00%	0.00%	0.15%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.25%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.00%	7.83%	0.58%	0.00%	0.00%	1.27%	0.00%	0.00%	2.11%	13.10%	0.27%	0.00%	0.39%
한국산 (2)	K_CN1	K_CN2	K_CN3	K_CB1	K_CB2	K_CB3	K_GG1	K_GG2	K_GG3	K_GW1	K_GW2	K_JJ1	
<i>Pantoea eucrina</i>	5.16%	53.30%	0.03%	29.30%	33.80%	0.03%	58.50%	0.17%	0.00%	61.94%	0.04%	1.02%	
<i>Pseudomonas oryziphobans</i>	19.80%	30.80%	69.50%	60.10%	37.80%	66.54%	0.07%	4.61%	0.10%	7.93%	0.02%	13.10%	
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.44%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.36%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Bacillus wiedmannii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	12.50%	0.03%	0.00%	
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.03%	0.00%	0.00%	77.60%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Enterobacter cloacae</i>	60.80%	0.34%	0.10%	0.12%	0.00%	0.04%	0.31%	0.74%	0.05%	12.70%	0.35%	0.00%	
<i>Pantoea septica</i>	0.11%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3.08%	1.40%	0.00%	0.01%	0.00%	7.33%	0.00%	1.85%	14.40%	0.05%	7.02%	27.60%	
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.04%	0.00%	0.00%	0.72%	3.54%	4.15%	0.00%	11.90%	0.00%	0.00%	7.34%	1.35%	
외국산	O_C1	O_C2	O_C3	O_C4	O_C5	O_C6	O_A1	O_A2	O_A3	O_I1	O_I2		
<i>Pantoea eucrina</i>	0.03%	13.00%	0.01%	33.40%	43.40%	0.70%	52.30%	46.20%	64.70%	44.90%	4.25%		
<i>Pseudomonas oryziphobans</i>	0.18%	13.50%	60.40%	43.50%	44.70%	3.86%	31.60%	26.40%	0.01%	17.60%	6.00%		
<i>Pantoea wallisii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	66.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
<i>Pantoea dispersa</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
<i>Bacillus wiedmannii</i>	49.80%	0.02%	0.00%	0.00%	0.05%	0.06%	0.00%	0.09%	0.05%	0.12%	0.04%		
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.01%	0.02%	0.00%	0.03%	0.19%		
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	68.60%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.14%	0.00%	0.00%	0.30%	0.52%	0.91%	0.37%	0.03%	0.09%	0.43%	0.05%		
<i>Pantoea septica</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.07%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.02%	0.02%	0.03%		
<i>Xanthomonas nasturtii</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.16%	0.00%	0.00%	0.41%	0.33%	1.09%	0.25%	0.00%		

표 117. 벼 왕겨 16S metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 세균군집 분포

	오대												일품				
	1-CCO	3-SJO	5-JJO	8-SWO	10-HSO	12-CJO	14-CWO	2-CCI	4-SJI	6-JJI	7-MVI	9-SWI	11-HSI	13-CJI			
	춘천O	상주O	전주O	수원O	화성O	청주O	철원O	춘천I	상주I	전주I	밀양I	수원I	화성I	청주I			
<i>Pantoea agglomerans</i>	8.51%	13.10%	10.30%	11.80%	0.00%	5.33%	0.00%	3.50%	0.00%	50.70%	49.20%	44.10%	43.00%	11.60%			
<i>Pantoea anthophila</i>	8.99%	2.62%	6.14%	10.90%	11.20%	16.80%	66.10%	48.40%	23.30%	7.90%	20.40%	22.00%	16.20%	14.00%			
<i>Pseudomonas oryziphobans</i>	0.00%	49.30%	9.49%	2.45%	50.10%	8.40%	11.40%	5.64%	55.40%	19.30%	0.00%	4.93%	15.80%	57.80%			
<i>Paenibacillus bovis</i>	0.00%	0.00%	2.35%	11.00%	3.27%	41.80%	5.66%	15.50%	2.78%	1.96%	3.33%	3.40%	0.00%	0.00%			
<i>Kosakonia cowanii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	46.60%	2.14%	10.70%	4.31%	3.53%	0.00%	0.11%	8.12%	0.00%	8.45%	0.00%			
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	1.40%	0.00%	20.30%	0.00%	14.80%	4.12%	2.63%	0.00%	0.00%	3.62%	0.00%	0.72%	0.00%	0.00%			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	49.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%			
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	3.18%	0.00%	6.37%	0.00%	2.12%	0.54%	2.04%	3.44%	2.16%	1.75%	2.84%	0.00%	6.04%	1.47%			
<i>Pantoea deleyi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	4.81%	0.00%	2.11%	0.00%	7.18%	0.00%	0.00%	3.77%	5.20%	2.15%	0.00%			
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0.00%	2.05%	7.36%	1.67%	2.08%	2.37%	0.00%	0.85%	0.00%	2.17%	2.45%	1.83%	0.65%	3.65%			
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	2.90%	2.99%	11.30%	1.25%	0.00%	0.97%	1.91%	0.00%	2.92%	1.43%	0.00%	0.78%	0.44%	2.17%			
<i>Methylobacterium indicum</i>	0.00%	0.00%	9.39%	1.28%	0.00%	2.31%	0.00%	0.00%	3.60%	5.11%	0.00%	1.65%	0.97%	0.00%			
<i>Methylobacterium indicum</i>	7.43%	3.91%	0.00%	0.14%	0.00%	0.00%	2.83%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.62%			
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	0.18%	16.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.14%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%			

참깨 세균 metagenome에서 ANOVA 분석을 통해 그나마 마커로 가능성이 큰 종은 *Bacillus circulans*과 *Sphingomonas roseiflava*인데 (표 118) 우점종들이 아니어서 실험에 어려움이 있을 가능성도 크다.

표 118. 국내와 외국산 참깨의 ANOVA 분석으로 발견된 주목할만한 세균종들 (p<0.05)

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	Bonferroni_P	Korea_mean	Foreign_mean	Species
OTU_0035	6.32	0.0168	0.47	0.72	65.28	1280.64	<i>Bacillus circulans</i>
OTU_0016	5.48	0.0253	0.47	1.00	507.00	4080.00	<i>Sphingomonas roseiflava</i>

벼 16S rRNA metagenome에 사용한 왕겨는 외국산을 확보할 수 없어서 국내산 중 동일지역에서 생산된 오대벼와 일품벼로 품종을 나눠서 비교분석하였는데, 오대벼에서 발견된 세균군집이 좀더 다양하고 (그림 171, 그림 172), ANOVA 분석에서 차이가 있는 세균들이 여럿 발견되었다 (표 119). 특히, 가장 많은 reads가 발견된 *P. agglomerans*가 포함된 것이 고무적인데, 오대벼에도 상당수가 발견되므로 정량적인 비교분석이 필요할 것으로 보인다.

표 119. 오대벼와 일품벼간의 ANOVA 분석으로 발견된 주목할만한 세균종들 (p<0.05)

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	Bonferroni_P	Ilpoom_mean	Odae_mean	species
OTU_0001	8.00	0.0152	0.44	1.00	27525.29	6367.14	<i>Pantoea agglomerans</i>
OTU_0015	5.95	0.0312	0.44	1.00	1844.29	170.57	<i>Pseudoxanthomonas icgebensis</i>
OTU_0006	5.25	0.0408	0.44	1.00	563.57	6913.86	<i>Sphingomonas adhaesiva</i>
OTU_0026	5.13	0.0428	0.44	1.00	0.00	176.86	<i>Chryseobacterium camelliae</i>

(나) ITS metagenome sequencing을 통한 진균군집 분석결과 요약

ITS metagenome sequencing을 통해 얻은 대두, 참깨, 벼의 주요 진균 군집 분포는 표 120, 120, 122과 같은데, 이중 3가지 농산물에 공통적으로 존재하는 *Cladosporium welwitschiicola* (*C. herbarum* 근연종)은 세계적으로 공통적으로 흔히 발견되는 곰팡이로 건조한 환경에서 강한 특성이 있는데, 이는 농산물의 보관 환경에 관련 큰 것으로 추측된다.

국내산 대두에서는 건조에 강한 곰팡이로 알려진 *Aspergillus vitricola*가 가장 많이 발견된 반면, 중국산 대두는 감자에서 괴저병을 일으키는 것으로 알려진 *Boeremia foveata*나 leaf rot을 일으키는 *Cercospora cyperina* 같은 병원성 곰팡이의 비율이 높은 특징이 있는데, 농산물의 건조도와 관련이 클 것으로 추측된다.

표 120. 대두 ITS metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 진균 군집 분포

종 raw	한국산	중국산	종 %ratio	한국산	중국산
<i>Aspergillus vitricola</i>	5,890	-	<i>Aspergillus vitricola</i>	49.80%	0.00%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	3,344	270	<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	28.30%	16.50%
<i>Epicoccum italicum</i>	774	-	<i>Epicoccum italicum</i>	6.54%	0.00%
<i>Boeremia foveata</i>	-	607	<i>Boeremia foveata</i>	0.00%	37.20%
<i>Hannaella oryzae</i>	369	-	<i>Hannaella oryzae</i>	3.12%	0.00%
<i>Cercospora cyperina</i>	75	170	<i>Cercospora cyperina</i>	0.63%	10.40%

국내산 참깨에서는 *Alternaria alstroemeriae*나 *A. simsimi*같은 *Alternaria*속 곰팡이가 주로 분포하는 반면, 중국산 참깨는 *Aspergillus tubingensis*가 주로 분포하는 시료가 많고, O-C1처럼 극단적으로 진균 군집이 적고 세균 군집이 주로 이루는 시료도 있었다. 또, 아프리카산에서는 *A. simsimi*와 *Macrophomina pseudophaseolina*이 주로 분포하는데, *M. pseudophaseolina*는 charcoal rot을 일으키는 병원성 곰팡이이다. 또, 인도산 (I1)은 *A. alstroemeriae* *A. tubingensis*, *M. pseudophaseolina*가 비슷한 비율로 존재하고, 파키스탄산 (I2)은 *C. welwitschiicola* 49.1%와 *A. alstroemeriae* 28.4%로 과반수 이상 분포하는 특성은 국내산과 외국산 판별에 유용할 것으로 판단된다.

표 121. 함께 ITS metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 진균군집 분포

한국산 (1)	JB1	JB2	JB3	JN1	JN2	JN3	JN4	GB1	GB2	GB3	GN1	GN2	GN3
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	79.40%	0.00%	29.50%	38.90%	22.40%	44.80%	0.00%	56.20%	0.00%	62.40%	0.00%	0.00%	50.30%
<i>Alternaria simsimi</i>	0.01%	80.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	45.90%	0.02%	83.10%	0.00%	16.80%	0.00%	0.00%
<i>Corynespora torulosa</i>	2.60%	1.27%	9.14%	5.21%	26.70%	7.05%	2.92%	3.98%	3.12%	1.67%	0.17%	1.50%	0.08%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	4.66%	0.00%	1.67%	29.90%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0.00%	0.94%	0.20%	4.20%	21.70%	17.50%	3.61%	0.00%	3.08%	0.00%	0.03%	0.50%	0.10%
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	0.00%	3.76%	3.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.06%	0.00%
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.15%	0.00%	0.29%	0.70%	0.00%	0.00%	0.26%	0.07%	0.02%	1.28%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Filobasidium magnum</i>	0.76%	0.12%	0.64%	0.85%	0.17%	1.74%	0.04%	0.02%	0.15%	0.09%	36.60%	50.70%	10.60%
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.62%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
한국산 (2)	CN1	CN2	CN3	CB1	CB2	CB3	GG1	GG2	GG3	GW1	GW2	JJ1	
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	30.70%	48.60%	24.90%	60.20%	0.00%	41.40%	36.80%	34.10%	0.02%	16.50%	36.20%	66.90%	
<i>Alternaria simsimi</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	18.30%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Corynespora torulosa</i>	28.80%	32.80%	0.01%	3.13%	0.00%	16.30%	0.02%	1.30%	0.01%	4.38%	0.02%	7.83%	
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.00%	48.10%	9.58%	0.00%	0.80%	0.50%	6.90%	0.00%	0.00%	8.60%	0.00%	
<i>Cladosporium oxysporum</i>	1.10%	0.00%	0.00%	0.00%	10.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.08%	0.37%	1.70%	0.00%	48.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
<i>Filobasidium magnum</i>	0.67%	0.64%	0.64%	0.62%	0.11%	0.03%	0.05%	0.50%	0.00%	0.17%	0.05%	0.66%	
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	6.10%	0.00%	3.50%	0.00%	61.50%	23.60%	0.00%	
외국산	C1	C2	C3	C4	C5	C6	A1	A2	A3	I1	I2		
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.75%	1.28%	0.00%	0.00%	0.00%	5.30%	28.40%		
<i>Alternaria simsimi</i>	0.16%	0.00%	21.70%	8.59%	0.00%	0.00%	23.30%	21.10%	21.80%	0.00%	0.00%		
<i>Corynespora torulosa</i>	0.00%	3.07%	0.04%	5.19%	0.85%	0.00%	3.12%	2.19%	4.84%	2.64%	8.61%		
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.90%	0.00%	18.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	9.44%	0.00%	49.10%		
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0.00%	0.00%	4.83%	0.00%	1.18%	0.84%	1.40%	0.00%	0.00%	1.40%	0.00%		
<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.00%	46.60%	28.20%	23.60%	0.00%	0.00%	0.00%	9.01%	0.00%	20.20%	0.00%		
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	0.00%	16.90%	4.97%	4.27%	0.00%	0.75%	21.80%	29.80%	29.00%	33.40%	0.89%		
<i>Filobasidium magnum</i>	0.00%	0.11%	0.00%	0.02%	0.08%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.10%	0.05%		
<i>Aspergillus vitricola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		

실제로 이런 특성은 국내산과 외국산 함께 군집간의 ANOVA 분석 (표 122)으로도 확인되었는데, *A. alstroemeriae*, *A. tubingensis*, *M. pseudophaseolina* 등이 통계적으로도 유의미한 차이를 보이므로 바이오마커 제작에 쉽게 응용 가능할 것으로 판단된다.

표 122. ANOVA 분석을 통한 국내산과 외국산 함께의 구분 가능한 진균종들 (p<0.05)

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	Bonferroni_P	Korea_mean	Foreign_mean	species
OTU_0019	20.24	7.60E-05	0.00	0.00	0.80	7284.18	<i>unclassified_Capnodiales</i>
OTU_0001	12.57	0.0012	0.03	0.06	50639.12	6745.36	<i>Alternaria alstroemeriae</i>
OTU_0032	11.27	0.0020	0.03	0.10	214.16	2151.18	<i>Epicoccum viticis</i>
OTU_0006	10.46	0.0027	0.04	0.14	1740.16	18820.36	<i>Aspergillus tubingensis</i>
OTU_0030	8.89	0.0053	0.06	0.28	0.00	3676.55	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>
OTU_0007	7.47	0.0099	0.09	0.52	3443.60	20917.45	<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>
OTU_0013	6.10	0.0187	0.14	0.99	3966.32	11.18	<i>Moesziomyces rugulosus</i>

국내산 벼의 경우, 동일한 조건에서 동시에 도정된 왕겨, 현미, 백미 시료를 확보하여 농산물 현태에 따른 벼 종자내의 진균 군집의 생태학적 분포변화도 살펴볼 수 있었는데, 그 결과 현미에서 *Moesziomyces antarcticus*가 100%에 가깝게 집중되었고, 그 외부층인 왕겨에서도 50~70%의 높은 비율을 보이는 반면, 현미에서 쌀겨층까지 제거된 백미에서는 40% 이하로 급격히 떨어지는 것으로 보였는데, 이 *Moesziomyces* 속 곰팡이들은 biocontrol agent로 널리 알려진 것들이었다. 또, 유일하게 *M. antarcticus* 비율이 77.5%로 비교적 낮아진 춘천산 시료의 경우, *Fusarium pseudocircinatum*이 22.5%를 보였는데, 벼 종자에서 바카나병을 일으킨다고 알려진 *F. fujikuroi*와 ITS sequence가 100% 일치하는 것으로보아 실제로는 *F. fujikuroi*에 감염되어 있는 것으로 보인다. 그리고, 이 곰팡이가 왕겨층에서 4.77% 비율로 발견된 반면, 백미층에서는 전혀 발견되지 않은 것으로보아 백미형태로 도정하면 제거됨을 알 수 있다. 이런 특징을 왕겨층에서 발견된 시료당 58~129 종의 진균과 22~44종의 세균군집들을 고려해보면, 건강한 국내산 벼는 *M. antarcticus*가 천연 biocontrol agent로 다른 병원성 진균이나 세균을 방어하는 천연 biocontrol agent 역할을 하고있는 것으로 보인다.

표 123. 벼 ITS metagenome 분석에 의해 얻어진 주요 진균군집 분포

왕겨	1-CCO 춘천O	2-CCI 춘천I	3-SJO 상주O	4-SJI 상주I	5-JJO 전주O	6-JJI 전주I	7-MYI 밀양I	8-SWO 수원O	9-SWI 수원I	10-HSO 화성O	11-HSI 화성I	12-CJO 청주O	13-CJI 청주I	14-CWO 철원O
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	71.80%	51.30%	60.20%	78.90%	82.30%	78.70%	75.00%	51.30%	66.80%	50.50%	61.60%	89.70%	74.80%	76.70%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.02%	0.00%	0.15%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	4.46%	5.07%	16.60%	5.83%	4.35%	4.09%	6.14%	7.30%	3.68%	24.80%	7.20%	1.78%	8.94%	7.54%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	1.21%	0.03%	4.58%	0.08%	0.64%	0.11%	0.05%	1.69%	0.17%	0.85%	0.14%	0.23%	0.42%	0.05%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.02%	0.00%	0.04%	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Sakaguchia cladiensis</i>	5.47%	22.90%	0.41%	2.53%	0.68%	0.36%	0.28%	0.63%	15.10%	0.05%	8.91%	0.00%	0.32%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	4.77%	1.21%	0.23%	0.47%	5.27%	1.06%	0.90%	2.10%	0.26%	13.20%	0.30%	0.59%	1.64%	1.68%
<i>Epicoccum poae</i>	0.92%	0.09%	0.57%	0.24%	0.00%	0.00%	0.01%	0.09%	0.03%	0.28%	0.06%	0.02%	0.13%	0.89%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum viticis</i>	2.84%	1.96%	7.24%	2.11%	2.01%	2.24%	3.43%	1.89%	1.03%	0.89%	0.00%	2.90%	0.22%	0.30%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.25%	0.20%	1.43%	0.31%	0.09%	0.83%	0.05%	6.75%	0.01%	1.15%	0.00%	1.37%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	0.00%	0.09%	1.22%	0.07%	0.00%	0.03%	0.06%	0.11%	0.18%	0.30%

현미	CCO-2 춘천2	HSO-2 화성2	SWO-2 수원2	CJO-2 청주2	JJO-2 전주2	SJO-2 상주2	HLH-2 헤이룽장2	LOH-2 랴오닝2	SXC-2 산시2	SDT-2 산둥2	HNX-2 허난2	SCN-2 쓰촨2	HUH-2 후베이2	JST-2 장쑤2
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	77.50%	97.70%	100.00%	100.00%	91.00%	100.00%	20.70%	86.80%	5.55%	0.00%	0.00%	5.01%	76.30%	0.00%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	88.40%	100.00%	0.00%	83.40%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.69%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.36%	0.00%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	94.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.00%	2.34%	0.00%	0.00%	5.20%	0.00%	2.23%	10.40%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.28%	0.00%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	55.60%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Sakaguchia cladiensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.28%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	22.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.38%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	39.40%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum viticis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	18.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.17%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.62%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

백미	CCO-3 춘천3	HSO-3 화성3	JJO-3 전주3	HLH-3 헤이룽장3	LOH-3 랴오닝3	HNX-3 허난3
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	32.50%	18.60%	45.30%	4.03%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus brunneus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	21.50%	76.20%	100.00%
<i>Cladosporium welwitschiicola</i>	0.00%	5.91%	3.95%	2.74%	2.24%	0.00%
<i>Naganishia diffluens</i>	0.00%	0.00%	0.00%	29.10%	0.00%	0.00%
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	8.65%	13.20%	42.60%	4.61%	10.10%	0.00%
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
unclassified <i>Sakaguchia cladiensis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	0.00%	6.06%	0.00%	0.00%	2.32%	0.00%
<i>Epicoccum poae</i>	14.30%	29.30%	0.00%	18.80%	0.00%	0.00%
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Epicoccum viticis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	13.70%	2.02%	0.00%	0.00%	2.88%	0.00%
<i>Fusarium boothii</i>	0.00%	15.80%	2.76%	4.40%	0.00%	0.00%

중국산 현미의 경우, 랴오닝성과 후베이성 시료는 국내산과 비슷하게 *M. antarcticus*가 86.8%와 76.3%로 주로 분포하는 반면, 산둥, 허난, 장쑤성의 시료들은 *Aspergillus brunneus*가 80% 이상의 높은 비율로 분포하고, 산시성 시료는 *Naganishia diffuens*가 94.4%로 주로 분포하는 전혀 다른 특성을 보인다. 이들은 모두 건조한 환경에 잘 견디는 곰팡이들인데, *M. antarcticus*와 마찬가지로 원래부터 biocontrol agent로 존재하는 것인지 보관 및 유통과정에서 *M. antarcticus* 보호막이 사라지면서 새롭게 형성되는 곰팡이층인지 향후 실험을 통하여 확인이 필요하다. 또, 랴오닝성 및 허난성 백미에서도 *A. brunneus*가 매우 높게 발견되는데, 랴오닝산 시료는 현미에서는 *M. antarcticus*가 높은 반면 백미에선 *A. brunneus*가 분포도가 높다.

표 124. 국내와 중국산 벼들간의 ANOVA 분석으로 발견된 주목할만한 진균종들 (p<0.05)

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	Bonferroni_P	WhiteK_mea	BrownK_mea	WhiteC_mea	chaff_mea	BrownC_mea	species
OTU_0001	18.18	1.42E-07	4.27E-06	4.27E-06	46707.00	137194.83	1954.00	100738.86	35326.25	<i>Moesziomyces antarcticus</i>
OTU_0005	9.49	4.94E-05	0.0007	0.0015	31258.67	1826.83	7110.67	1064.50	2889.88	<i>Alternaria alstroemeriae</i>
OTU_0010	6.79	0.0005	0.0055	0.0165	21130.00	0.00	9130.33	346.71	0.00	<i>Epicoccum poae</i>
OTU_0002	6.09	0.0011	0.0077	0.0332	0.00	0.00	95781.67	22.43	49401.13	<i>Aspergillus brunneus</i>
OTU_0019	5.80	0.0015	0.0077	0.0445	8623.33	0.00	0.00	475.64	0.00	<i>Nigrospora pyriformis</i>
OTU_0003	5.76	0.0015	0.0077	0.0461	4780.67	408.33	2415.67	11196.64	429.00	<i>Cladosporium welwitschiicola</i>
OTU_0014	4.17	0.0087	0.0372	0.2603	9004.33	0.00	2133.67	226.43	748.00	<i>Fusarium boothii</i>
OTU_0027	3.30	0.0239	0.0686	0.7175	0.00	0.00	4702.67	1.50	0.00	<i>Rhodotorula alborubescens</i>
OTU_0046	3.30	0.0241	0.0686	0.7215	0.00	0.00	1807.33	3.21	0.00	<i>unclassified_Aspergillaceae</i>
OTU_0023	3.29	0.0243	0.0686	0.7305	5713.67	0.00	0.00	29.21	0.00	<i>Curvularia soli</i>
OTU_0037	3.26	0.0251	0.0686	0.7542	2266.33	0.00	0.00	28.07	0.00	<i>unclassified_Pleosporaceae</i>
OTU_0013	2.99	0.0349	0.0872	1.0000	7634.00	0.00	1395.67	1291.50	293.63	<i>Fusarium equiseti</i>

ANOVA 분석을 통하여 국내산 왕겨, 국내산 현미, 중국산 현미, 국내산 백미, 중국산 백미를 구별하기에 통계적으로 유의미한 종들은 (표 124)와 같은데, *M. antarcticus*, *A. brunneus*, *Cladosporium welwitschiicola*, *Alternaria alstroemeriae* 같이 매우 높은 비율로 발견된 균들이 대부분 포함되어있어서 마커개발에 유용할 것으로 보인다.

마. 위탁연구기관: 국립농산물품질관리원 신병곤 연구사
 농산물 시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용

(1) 원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상 선정

(가) 농산물 현황 조사 및 대상 선정

- 시료 선정은 농산물품질관리원 자체적으로 실시한 수요조사, 원산지 위변조 사례 및 국내 생산/유통/수입되는 각 농산물 총량 (농림축산식품부 통계자료, 식물검역 통계자료, 관세청 통계자료 참조) 등을 근거로 1차적으로 대두, 참깨, 쌀 등을 선정함.
- 현재 우리나라의 대두 소비는 대부분 수입에 의존하고 있다. 2018년 대두의 자급률은 25% 수준이며, 소비량의 75%를 수입하는 품목이다. 또한 두류 중 대두의 수입량이 대부분을 차지하였고, 주요수입국은 미국, 중국 등이었다.
- 참깨는 국내에 유통/소비/수입되는 양이 많고, 우리나라 농산물 중 원산지 위변조 사례가 많은 것 중 하나이다.
- 통계청에서 실시한 2019년 농촌경제연구원 조사 결과에 따르면 1인당 연간 쌀 소비량은 60.3kg으로 소비량이 많은 농산물 중 하나이며, 우리나라 주식으로 의미가 있다.

(나) 콩 유통 현황 및 시료 수집

① 콩 현황

- 콩 국내 생산량

	2015년	2016년	2017년	2018년
생산량(톤)	124,001	106,566	75,448	85,644

- 2016년 콩 생산량은 2015년 대비 14.1% 감소한 10만 6천톤, 2018년 생산량은 8만 5천톤으로, 2015년 대비 30% 감소하였다.

- 콩 수입량

- 콩의 수입량은 연평균 27만톤 내외이며 일반콩의 주요 수입국은 미국, 중국이다.
- 수입 국가별 비중은 미국 87%, 중국 4%등 이다.
- 콩은 국내 소비량의 약 75%를 수입하는 수입의존도가 높은 품목임

- 콩 가격

- 콩 가격은 국산 5,621원/kg, 외국산 4,117원/kg으로 국산이 1.4배 높아 원산지 표시 위반이 많은 품목이다.

② 시료 수집

- 콩 시료는 원산지가 정확한 총 68점의 시료를 수집하였다.
- o 총 68점 (국산 15개 지역 17점 / 외국산 5개 국가 51점)

- 수집한 시료를 주관기관 및 협동기관에 송부하였다.

표 125. 국산 시료 수집 내역 (1차)

국산 시료	도	시군
1	충남	논산
2	전북	군산
3	전남	강진
4	전남	강진
5	강원	영양
6	강원	인제
7	경기	안성
8	충북	보은
9	경남	함양
10	대구	달성
11	경기	파주
12	경기	이천
13	전북	완주
14	전북	완주
15	충남	천안
16	전남	나주
17	강원	횡성

표 126. 외국산 시료 수집 내역

외국산 시료	원산지 (국가)						
1	중국산	16	베트남	31	중국산	46	캐나다산
2	중국산	17	베트남	32	중국산	47	캐나다산
3	중국산	18	베트남	33	중국산	48	캐나다산
4	중국산	19	중국산	34	중국산	49	캐나다산
5	태국산	20	중국산	35	중국산	50	캐나다산
6	태국산	21	중국산	36	미국산	51	캐나다산
7	중국산	22	중국산	37	미국산		
8	캐나다산	23	중국산	38	미국산		
9	미국산	24	중국산	39	미국산		
10	중국산	25	중국산	40	미국산		
11	중국산	26	중국산	41	미국산		
12	중국산	27	중국산	42	캐나다산		
13	중국산	28	중국산	43	캐나다산		
14	베트남	29	중국산	44	캐나다산		
15	베트남	30	중국산	45	캐나다산		

- 콩 시료는 원산지가 정확한 총 18점의 시료를 추가 수집하였다.

◦ 총 18점 (국산 8개 도, 17개 지역 18점)

표 127. 국산 시료 수집 내역 (2차)

국산 시료	도	시군
1	충남	천안
2	충남	공주
3	경기	안성
4	경기	이천
5	전남	담양
6	전남	나주
7	전남	나주
8	전북	임실
9	강원	원주
10	충북	음성
11	충북	청주
12	강원	춘천
13	경북	청도
14	경북	경산
15	경북	의성
16	경남	밀양
17	경남	창녕
18	경남	진주

- 수집한 시료를 주관기관 및 협동기관에 송부하였다.

(다) 참깨 유통 현황 및 시료 수집

① 참깨 현황

- 참깨는 '18년 국내 생산량*은 '06년 대비 절반 수준으로 대폭 감소하였으나 수입량**은 지속적으로 증가추세에 있는 유지작물이다. 자급률은 15%에 불과하여 소비량의 대부분을 수입하고 있다.

* 생산량 : ('05) 20.9천톤 → ('06) 23.5 → ('16) 13.6 → ('18) 12.7

** 수입량 : ('05) 66.6천톤 → ('06) 74.2 → ('16) 77.9 → ('18) 72.0

- 국내산과 외국산의 가격*차이가 3배 이상 높아서 원산지 부정유통 사례가 발생하는 품목이다.

* 국내산 도매 가격 15,773원/kg, 중국산 4,393원/kg

- 참깨 국내 주요 생산지역은 전남, 경북, 전북, 경남, 충남, 충북 순으로 생산되고 있다. 주요 수입국은 인도, 중국이다.

② 시료 수집

- 참깨 시료는 원산지가 정확한 총 38점의 시료를 추가 수집하였다.

◦ 총 38점(국산 9개 도, 33개 지역 38점)

표 128. 참깨 시료 수집 내역

국산 시료	도	시군
1	경북	영천
2	전북	남원
3	경남	함안
4	전북	임실
5	충남	당진
6	경남	합천
7	경기	이천
8	경기	이천
9	경남	진주
10	전남	여수
11	경남	진주
12	전남	목포
13	전남	무안
14	전남	광주
15	충남	공주
16	충남	서천
17	전북	전주
18	전북	완주
19	전북	익산
20	제주	제주
21	경기	파주
22	경기	양평
23	강원	춘천
24	경남	창원
25	경기	고양
26	경기	김포
27	경북	안동
28	충북	괴산
29	경북	칠곡
30	강원	인제
31	경북	영주
32	충북	청주
33	경북	영주
34	충북	청주
35	충남	대전
36	경북	안동
37	경기	강화
38	충북	충주

- 수집한 시료를 주관기관 및 협동기관에 송부하였다.

(라) 쌀 유통 현황 및 시료 수집

① 쌀 현황

- 쌀은 '18년 국내 생산량은 387만톤으로 '05년 433만톤 대비 11% 수준으로 대폭 감소하였으나 수입량**은 44만톤 이상을 지속적으로 유지하는 추세이다.

* 생산량 : (2015) 433만톤 → ('18) 387만톤 11% 감소

** 수입량 : (2015) 46.8만톤 → ('18) 44.8천톤 4% 감소

- 국내산과 외국산 밥쌀용 쌀의 가격차이가 2.5배 이상 높아서 원산지 부정유통 사례가 발생하는 품목이다.

② 시료 수집

- 전국 8개 도의 쌀 시료 16점을 수집

표 129. 쌀 시료 수집 내역

국산 시료	도	시군
1	경기	과주
2	경기	연천
3	강원	횡성
4	강원	양양
5	충북	충주
6	충북	청주
7	충남	아산
8	충남	서산
9	전북	김제
10	전북	진안
11	전남	강진
12	전남	해남
13	경북	예천
14	경북	경주
15	경남	함안
16	경남	함안

- 수집한 시료를 주관기관 및 협동기관에 송부하였다.

(2) 원산지 단속에 적용을 위한 검증 실험

(가) 검증을 위한 시료 수집

- 콩 원산지가 증명된 시료를 직접 수집 (국내산 6점, 외국산 6점)

표 130. 원산지 검증 시료

국산 시료	도	시군
1	전북	장수
2	전남	담양
3	충남	공주
4	충북	음성
5	경북	의성
6	경남	진주

외국산 시료	국가	비고
1	미국산	
2	미국산	
3	미국산	
4	미국산	
5	미국산	
6	미국산	

(나) 검증 실험 결과

① 휘발성 대사체를 이용한 원산지 판별

- 주성분 분석 (PCA)과 이용하여 분석한 결과 국내와 국외에서 재배되는 대두 시료에서 검출된 대사체들의 차이를 확인할 수 있었다.

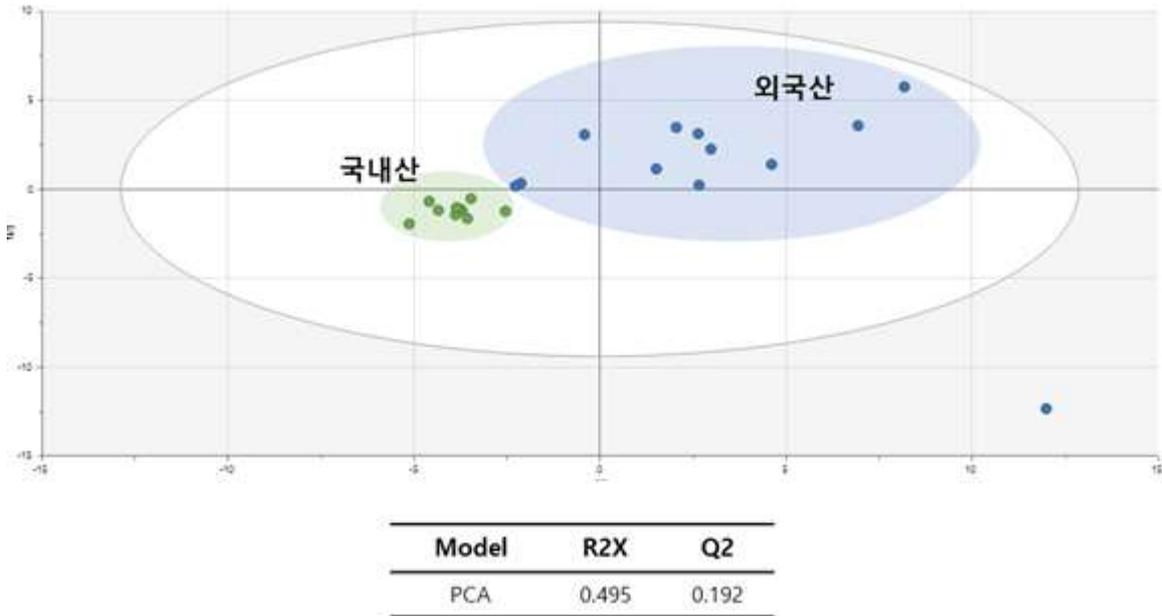


그림 182. 원산지 검증 시료에 대한 PCA 결과

- 직교부분최소자승판별 분석 (OPLS-DA)를 적용하여 분석한 결과, 그룹 간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었으며 주성분 분석과 비교하여 더욱 향상된 그룹간의 분리를 확인할 수 있었다.

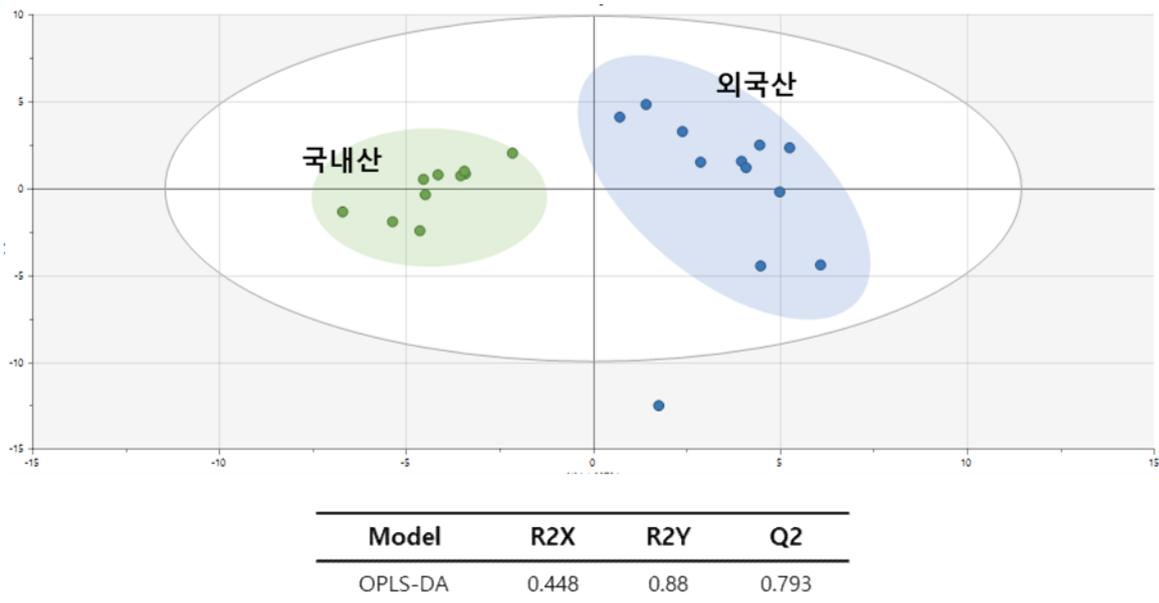


그림 183. 원산지 검증 시료에 대한 OPLS-DA 결과

- 주관연구기관에서 GC-MS 연구를 통해 발굴한 $vip > 1.5$ 이상인 대사물질 중 Oct-1-en-3-ol, 1,3-Dimethylbenzene, 2,5-Dimethylhexan-2-ol, 1,2-Dimethylbenzene, 2-Ethylhexan-1-ol, 1,2,3-Trimethylbenzene 로 ROC curve analysis를 수행하였다.
- 각각 AUC value는 국내산-others는 1.00 국외산-others는 1.00으로 높게 나온 것을 확인하였다.

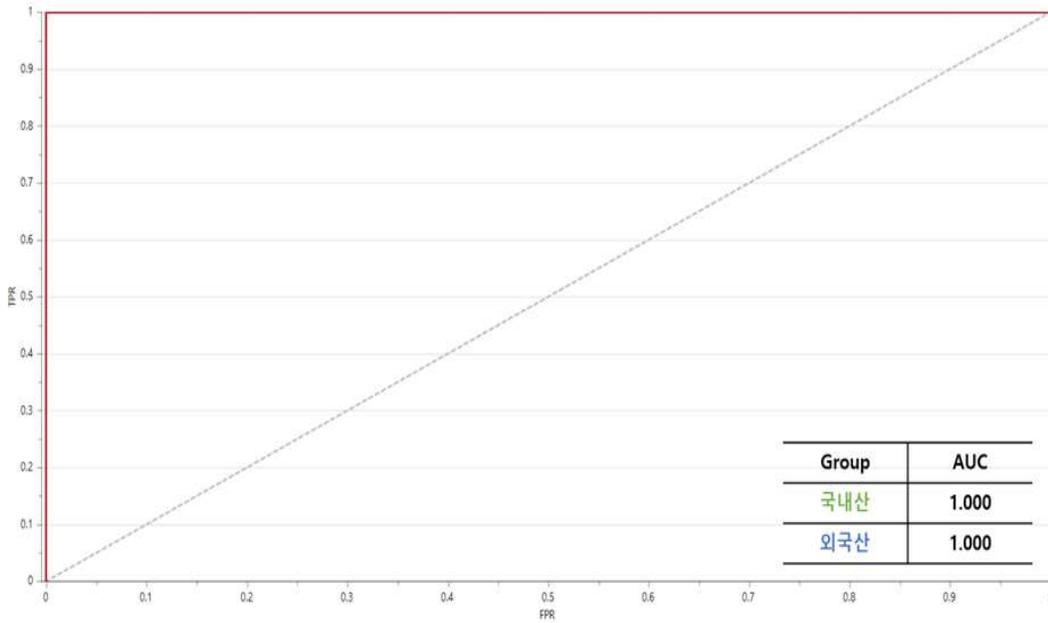


그림 184. 원산지 검증 시료에 대한 ROC curve analysis 결과

◦ 국내산 6점 중 국내산으로 판정 6점, 외국산 6점 중 외국산으로 판정 6점

- SPSS software를 통해 discriminant analysis 결과 검증 정확도는 100%로 나타남

표 131. 원산지 검증 시료에 대한 discriminant analysis 결과

		V1	예측 소속집단		전체
			국내산	국외산	
원래값	빈도	국내산	12	0	12
		국외산	0	12	12
	%	국내산	100.0	.0	100.0
		국외산	.0	100.0	100.0

② 대사체 분석 기술을 이용한 원산지 판별

(ㄱ) GC-TOF MS를 이용한 원산지 판별

- 주성분 분석 (PCA)과 이용하여 분석한 결과 국내와 국외에서 재배되는 대두 시료에서 검출된 대사체들의 차이를 확인할 수 있었다.

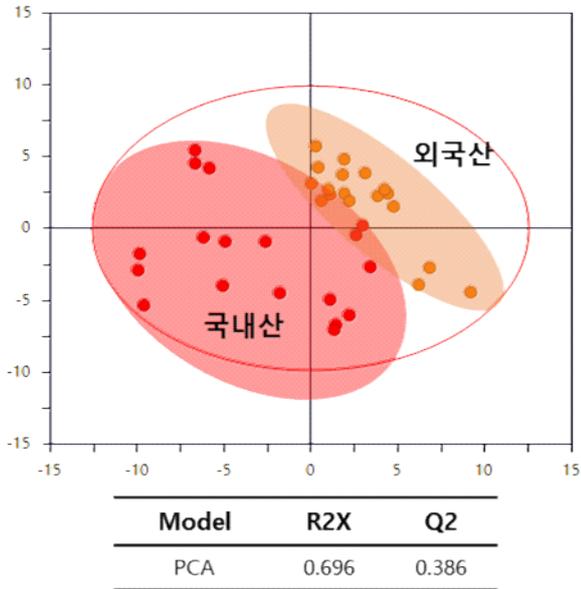


그림 185. 원산지 검증 시료에 대한 unsupervised multivariate statistics

- 부분최소자승판별(PLS-DA)를 적용하여 분석한 결과, 그룹간의 대사체 프로파일이 잘 분리되었으며 주성분 분석과 비교하여 더욱 향상된 그룹 간의 분리를 확인할 수 있었다.

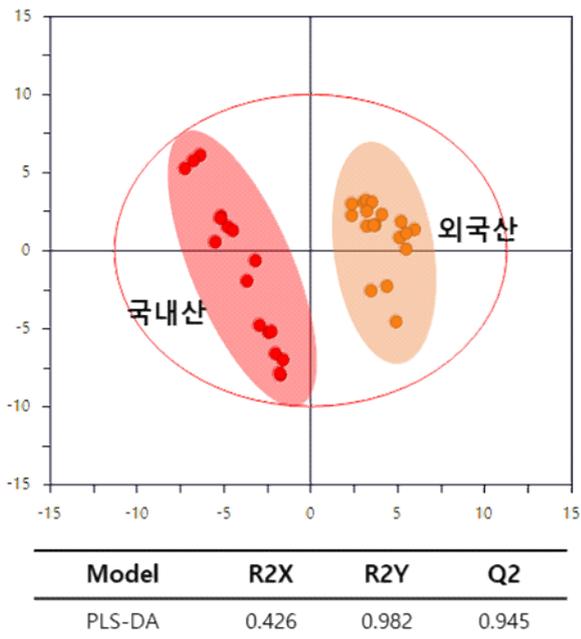


그림 186. 원산지 검증 시료에 대한 supervised multivariate statistics

- 공동연구기관에서 GC-TOF MS와 LC-Orbitrap MS 연구를 통해 발굴한 5개 대사물질 중 malic acid, fumaric acid, threonic acid, lyxose 로 ROC curve analysis를 수행하였다.
- 각각 AUC value는 국내산-others는 1.00 국외산-others는 1.00으로 3개의 국가(한국, 중국, 미국)의 대두 시료 분석에서의 AUC value 값보다 높게 나온 것을 확인하였다.

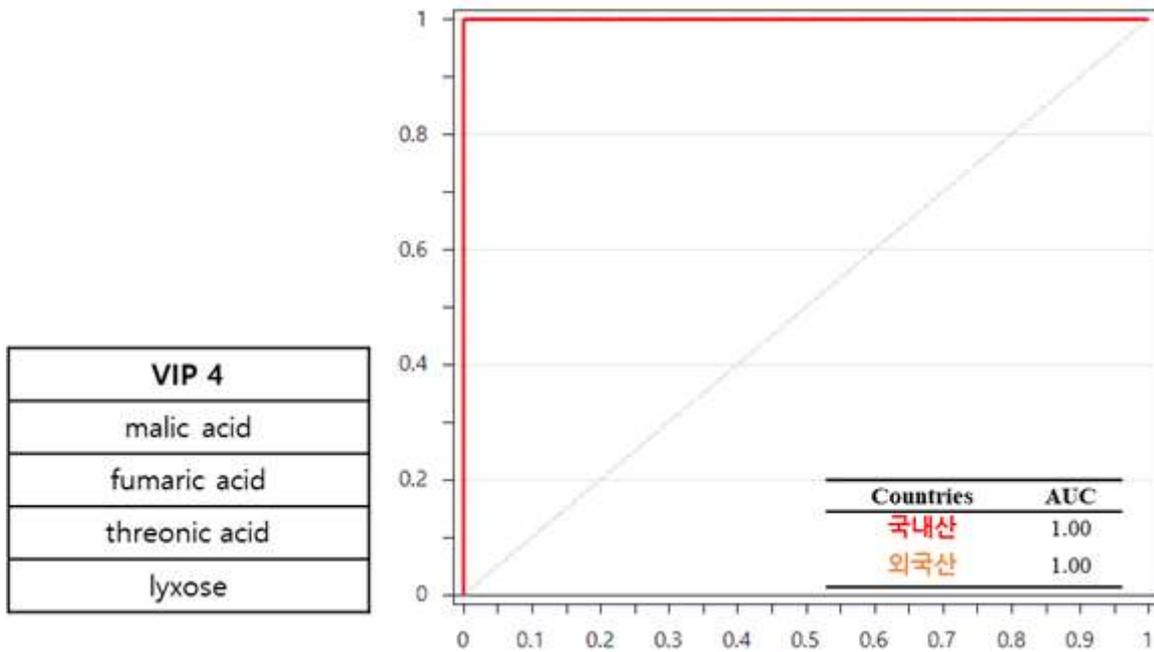


그림 187. 원산지 검증 시료에 대한 ROC curve analysis

- 국내산 6점 중 국내산으로 판정 6점, 외국산 6점 중 외국산으로 판정 6점
- 검증 정확도는 100%로 나타남

(ㄴ) NMR 분석을 이용한 원산지 판별

- 직교부분최소자승판별(OPLS-DA)를 적용하여 분석한 결과, 추가 검증 시료에 대해 국내산과 국외산 분리가 가능했으며 (R^2Y intercept = 0.323, Q^2Y intercept= -0.612), ROC curve analysis 결과 국내산과 국외산 모두 AUC value 값 0.99로 높은 정확도를 보였다.

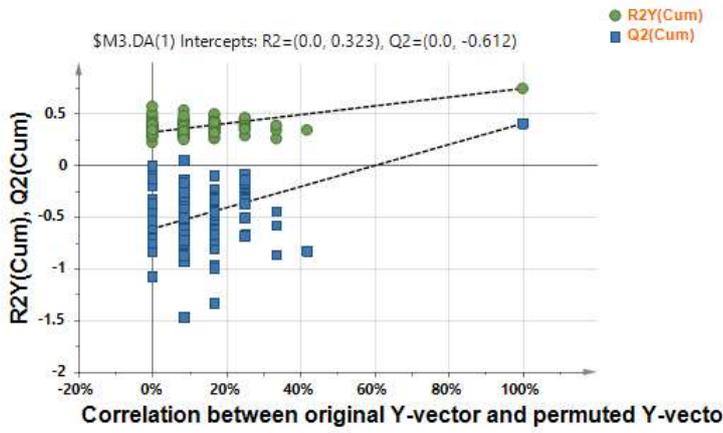
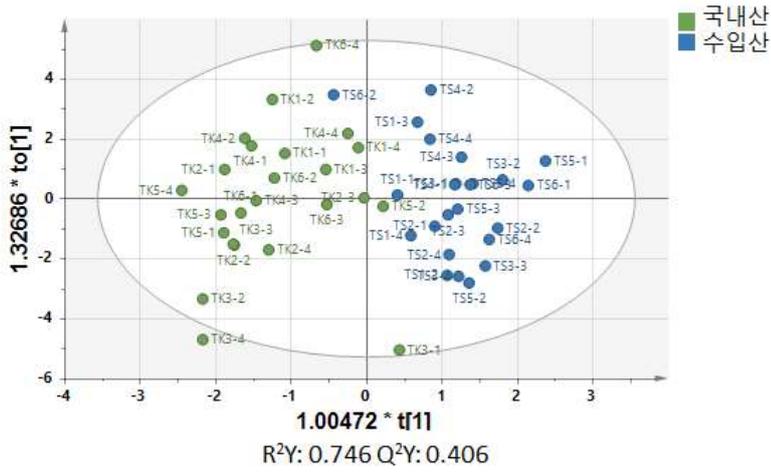


그림 188.원산지 검증 시료에 대한 OPLS-DA 결과

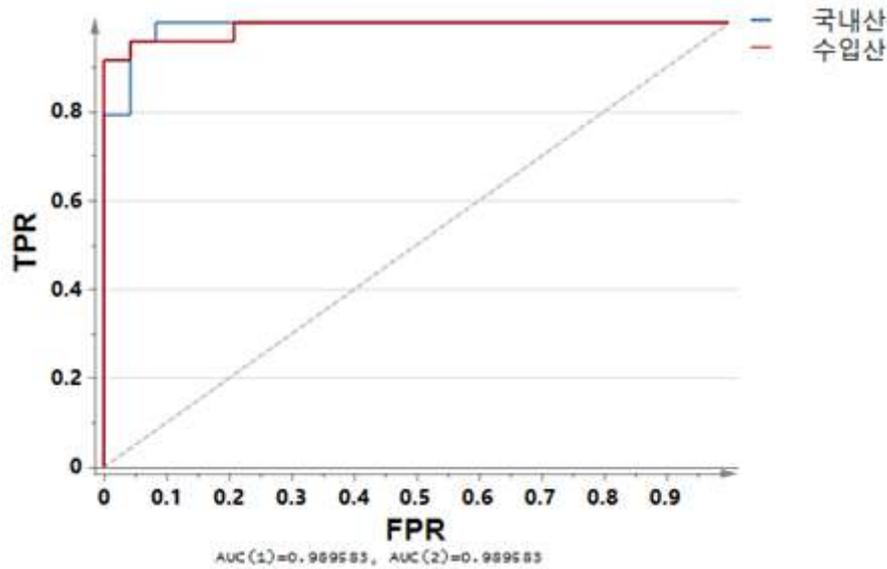


그림 189.원산지 검증 시료에 대한 ROC curve 결과

표 132. 정확도 산출 결과

	Members	Correct%	국내산	수입산	No class (YPred <= 0)
국내산	24	91.7	22	2	0
수입산	24	95.8	1	23	0
No class	0		0	0	0
Total	48	93.8	23	25	0

Fisher's prob. 2.10E-10

◦ 검증 정확도는 93.8%로 나타남

- 기존에 수립한 원산지 판별 모델에 검증 시료 데이터를 추가 적용하여 분석한 결과, 추가 검증 시료에 대해 국내산과 국외산 분리가 가능했으며 (R^2Y intercept = 0.129, Q^2Y intercept = -0.21), ROC curve analysis 결과 국내산과 국외산 모두 AUC value 값 0.96로 높은 정확도를 보였다.

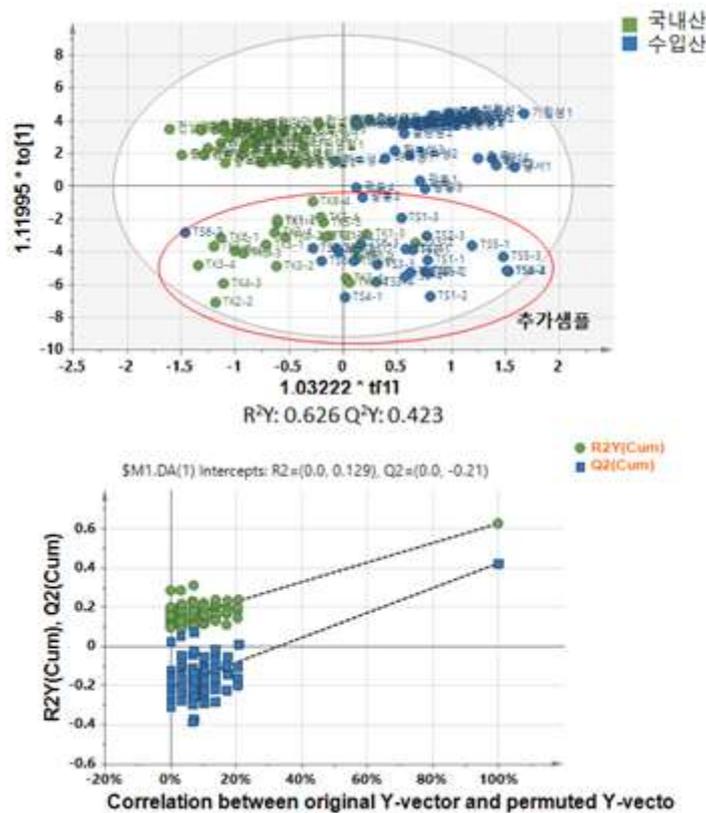


그림 190. 원산지 검증 시료를 기존 판별 모델에 적용한 OPLS-DA 결과

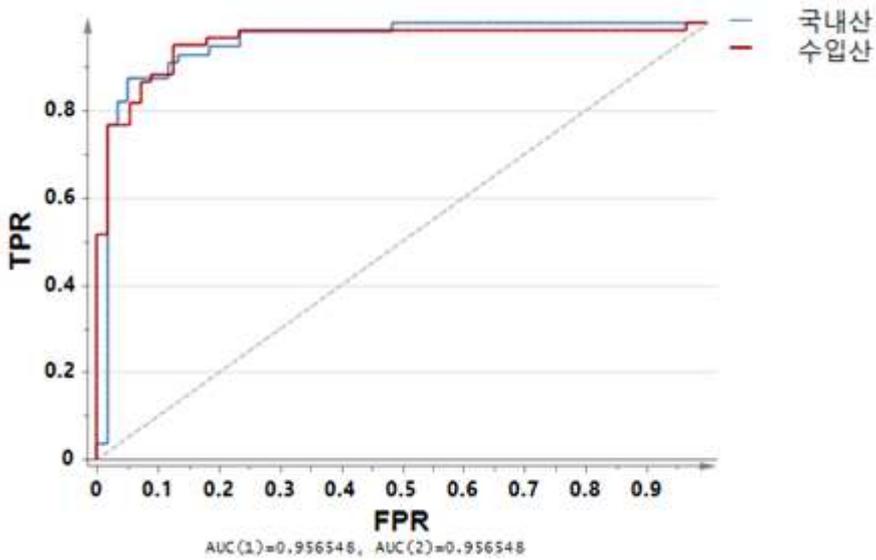


그림 191. ROC curve 결과

표 133. 정확도 산출 결과

	Members	Correct%	국내산	수입산	No class (YPred <= 0)
국내산	56	87.5	49	7	0
수입산	60	91.7	5	55	0
No class	0		0	0	0
Total	116	89.7	54	62	0
Fisher's prob. 2.70E-19					

- 검증 정확도는 89.7%로 나타남
 - 해당 모델에 기반하여 국내산과 국외산 샘플 분류가 잘 되었음.
- 원산지 단속에 적용을 위한 검증 실험 결과, 개발된 대사체 분석법을 이용시 국내산과 국외산 샘플 원산지 검증이 가능하며 추후 원산지 판별에 활용 가능하다.

(3) 원산지 단속을 위한 기존의 원산지 검정 방법과 병행한 분석법 활용

(가) 기존의 근적외선분광분석법을 이용한 결과

- 기존의 근적외선분광분석법을 이용한 원산지 판별 결과
 - 국내산 6점 중 국내산으로 판정 6점, 외국산 6점 중 외국산으로 판정 6점

(나) 개발된 분석법을 이용한 결과

- 대사체 분석 기술을 이용한 원산지 판별
 - 대사체 malic acid, fumaric acid, threonic acid, lyxose 를 이용한 콩 원산지 판별 결과
 - 국내산 6점 중 국내산으로 판정 6점, 외국산 6점 중 외국산으로 판정 6점

(다) 결과의 해석 및 활용

- 기존의 방법은 원산지 판별의 성분에 대한 정보를 얻을 수 없는 한계가 있었음
- 개발된 대사체 분석법을 이용한 판별 결과를 활용해 원산지 판별 성분에 대한 정보 파악 활용 가능

연구 결과 요약

○ 주관과제명 : MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 데이터 통합관리

(1차년도) 원산지 판별 대상 농산물 현황 조사를 통해 대두, 참깨, 쌀을 선정하였음. 대상 농산물인 대두 시료를 이용하여 시료 전처리 방법 별로 비교하였으며, 전처리를 하지 않은 intact 상태의 시료를 이용하여 휘발성 대사체를 추출하기로 하였음.

(2차년도) 국산과 수입산 대두는 40°C에서 SPME 분석법을 이용하여 휘발성 대사체를 추출하였음. 대두의 원산지 별 시료간 휘발성 대사체 차이를 확인하였음. 휘발성 대사체는 oct-1-en-3-ol, 2,5-dimethylhexan-2-ol과 같은 alcohol 류와 2-methylprop-1-ene, nonane, heptane와 같은 hydrocarbon 류가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

(3차년도) 국산과 수입산 참깨의 휘발성 대사체는 추출 방법 별 비교를 통해 확립한 방법인 180°C에서 roasting 하여 SPME 분석법을 이용하여 추출하였음. 다변량 통계분석 결과, 충청북도 청주와 중국 흑룡강성 하얼빈을 제외하고 원산지에 따라 분리되었음. 총 16개의 휘발성 대사체 (docosane, tricosane, heptadecan-2-one, 2-ethylhexan-1-ol, (E)-undec-2-enal, hexadecanoic acid, (E)-dec-2-enal, hexanal, furan-2-carbaldehyde, heneicosane, 2,6-ditert-butyl-4-methylphenol, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one, nonanal, 2-phenylacetaldehyde, 3-methylbutanal)가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

(4차년도) 국산과 수입산 쌀의 휘발성 대사체는 추출 방법 별 비교를 통해 확립한 방법인 60°C에서 boiling 하여 SPME 분석법을 이용하여 추출하였음. 다변량 통계분석 결과, 쌀의 원산지별 시료간 휘발성 대사체 분포 차이를 확인하였으며, 백미의 경우 총 6개 대사체 (2,2,6-trimethyldecane, 3,7-dimethyldecane, 3-ethyl-4-methylhexane, decan-2-one, 4-ethyl-2,2,6,6-tetramethylheptane, 2,5-dimethyloctane)가 선정되었으며, 현미의 경우 총 15개 대사체 (tetradecane, dodecane, methyl acetate (Z)-9-methylundec-5-ene, 3-methyl-5-propylnonane, 3,6-dimethyloctane, methyl nonanoate, 3-ethyl-2,2-dimethylpentane, 4,6-dimethylundecane, 2,2,4-trimethyldecane, hexan-1-ol, 2-pentylfuran, methyl pentanoate, heptanal, (E)-hept-2-enal)가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

○ 1공동과제명 : MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 검증모델 구축

(1차년도) 농산물의 효과적인 대사체 추출을 위해 다중 용매 조성 테스트를 통해 가장 효과적인 추출용매 조성인 isopropanol:MeOH:H₂O (3:3:2 v:v:v)를 확립하였음. 분리능 최적화를 위한 유도체화법을 검증하였으며 질량분석법을 최적화하였음. 또한 LC-MS raw data process를 개발하였으며 DB 인프라를 구축하였음.

(2차년도) 국산과 수입산 대두의 일차 대사산물, 이차 대사산물을 GC-TOF/MS, LC-Orbitrap Mass를 이용해 분석하여 총 174개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계분석 결과, 원산지별 시료 간의 대사체 차이를 확인하였으며, 5개의 대사물질 (choline, lyxose, malic acid, fumaric acid, threonic acid) 가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

(3차년도) 국산과 수입산 참깨의 이차 대사산물을 LC-Orbitrap Mass를 이용해 분석하여 총 138개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계분석 결과, 원산지별 시료 간의 대사체 차이를 확인하였으며, 총 5개의 대사체 (D-raffinose, L-glutathione (reduced), adenosine 5'-monophosphate, valine, 2-amino-1,3,4-octadecanetriol)가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

다년간 획득한 대두의 연도별 데이터 연계 분석을 통해 지역 특이적 대사체인 4-coumaric acid, betaine, N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine, prolylleucine를 확인하였으며, 연도와 지역의 상호작용하는 대사체로는 L-aspartic acid, coumarin, soyasaponin ya, acetyldaidzin, D-glutamine가 검출됨.

(4차년도) 국산과 중국산 쌀의 일차 대사산물, 이차 대사산물을 GC-TOF/MS, LC-Orbitrap Mass를 이용해 분석하여 총 130개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계분석 결과, 원산지별 시료 간의 대사체 차이를 확인하였으며 2개의 대사체 (2-hydroxycinnamic acid, citric acid) 가 잠재적 바이오마커로 선정됨.

○ 2공동과제명 : NMR 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석

(1차년도) 원산지 판별 대상 농산물인 쌀의 원산지 판별을 위한 농산물 (쌀겨)의 시료 추출법 및 기기 조건, 분석법을 최적화하였음.

(2차년도) 국산과 중국산 대두를 MeOD/D2O (1:1)를 이용하여 추출한 후 1D 및 2D NMR을 이용하여 분석하여 총 25개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계분석을 통해 원산지 판별 모델을 확립하였으며, 총 8개 대사체 (tartarate, galactarate, tryptophan, valine, raffinose/stachyose, isoleucine, citrate, alanine)가 잠재적 바이오마커 후보로 선정됨.

(3차년도) 동결 건조된 국산과 중국산 참깨를 Bligh & Dyer 분석법을 사용해 추출한 후 1D 및 2D NMR을 이용하여 분석하여 총 24개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계 분석을 통해 원산지 판별 모델을 확립하였으며, 총 6개 대사체 (tyrosine, acetate, phenylalanine, tryptophan, uridine, malate)가 잠재적인 바이오마커 후보로 선정됨.

참깨를 분쇄, 동결건조 후 FT-IR 분석을 수행하였으며, ① C-H stretching region (3,050-2,800 cm⁻¹), ② C=O stretching region (1,800-1,600 cm⁻¹), ③ C-O-C stretching and C-H bending region (1,600-650 cm⁻¹) 작용기가 구별 가능하였음. C-H stretching region (3,050-2,800 cm⁻¹)에서 2차 미분 normalization 적용 후 원산지 판별 모델을 확립하였음. 이 판별 검사 수행 시 기존 국립농산물품질관리원에서 사용하는 방법보다 2배 정도의 시간을 단축 시킬 수 있음.

(4차년도) 국산과 중국산 쌀을 분쇄, 동결건조 후 100% D2O를 이용하여 추출한 후 1D 및 2D NMR을 이용하여 분석하여 총 24개의 대사체가 검출되었음. 다변량 통계 분석을 통해 원산지 판별 모델을 확립하였으며, 백미와 경미의 경우 11개 대사체 (succinate, pyruvate, methionine, alanine, sucrose, fumarate, glutamine, aspartate, glucose, glutamate, glycolate)가, 현미의 경우 5개 대사체 (choline, glucose, maltose, sucrose, acetate)가 잠재적인 바이오마커 후보로 선정됨.

쌀을 분쇄, 동결건조 후 FT-IR 분석을 수행하였으며, FT-IR spectrum의 전체영역 (4,000~400 cm⁻¹)에서 1차 미분 normalization 방법을 사용하여 원산지 분리 모델을 확립하였음.

○ 협동과제명 : 미생물 군집 프로파일링을 활용한 원산지 판별용 마커 발굴

(1차년도) 선정 대상 농산물의 세균, 진균, 병원균 및 내생균을 조사하였음. 시료 전처리법과 DNA 추출법을 조사하여 효율이 높은 phosphate-buffered saline (PBS) 여과 방법과 PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO, cat# 12855-50)를 선택하였음.

(2차년도) 국산과 중국산 대두 시료를 수술용 매스로 상처를 낸 후 PBS버퍼에 침지하여 껍질만 분리하는 전처리 방법을 적용하여 미생물 군집을 분석하였음. 대두 16S rRNA 미생물 군집 분석 결과, 국산은 *Pantoea vagans*가 대부분을 차지하였음. 또한 ITS 미생물 군집 분석 결과 국산은 *Aspergillus vitricola*와 *Cladodsporium welwitschiicola*가 대부분을 차지하였음.

(3차년도) 국산과 수입산 참깨 시료를 50g의 시료를 200mL의 버퍼에 침지하는 방법을 적용하여 gDNA 추출하였음. 참깨 ITS 미생물 군집 분석 결과 국산 시료에서 *Alternaria* 속에 속하는 *Alternaria alstroemeriae*와 *Alternaria simsimi*가 과점하는 것을 확인하였음. 또한 중국산은 *Aspergillus* 속이, 아프리카산은 *Macrophomina*와 *Alternaria*가 비슷한 비율로 존재하였으며, 인도산은 *Macrophomina*, *Aspergillus*, *Alternaria*가 파키스탄산은 *Cladosporium*이 가장 많이 존재하였으며 원산지간 경향성 차이를 확인하였음.

(4차년도) 국산과 중국산 쌀 시료를 50g의 시료를 200mL의 버퍼에 침지하는 방법을 적용하여 gDNA 추출하였음. 쌀 ITS 미생물 군집 결과 국산에서는 *Moesziomyces antarcticus*가 중국산에서는 *Aspergillus brunneus*가 과점하는 것을 확인하였음.

또한 16S rRNA 미생물 군집 분석 결과 참깨에서 *Bacillus circulans*, *Sphingomonas roseiflava*와 벼에서 *P. agglomerans*등 4종이 잠재적인 미생물 군집 바이오마커 후보로 선정됨. 진균 ITS 미생물 군집 분석 결과 참깨에서 *A. alstroemeriae* 등 7종과 벼에서 *M. antarcticus* 등 12종이 잠재적인 미생물 군집 바이오마커 후보로 선정됨.

○ 위탁과제명 : 농산물 시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용

(1차년도) 대두 시료를 국산 15개 지역 17점, 수입산 5개 국가 51점 총 68점을 수집하였음.

(2차년도) 대두 시료 수집 국산 19개 지역 21점을 추가로 수집하였음.

(3차년도) 참깨 시료 국산 33개 지역 38점을 수집하였으며 대두 시료 국산 17개 지역 18점을 추가로 수집하였음

(4차년도) 백미 시료 국산 15개 지역 16점을 수집하였으며, 원산지 검증을 위해 대두 시료 국산 6점, 외국산 6점을 수집하였음. 본 연구에서 확립한 바이오 마커를 적용하여 원산지를 판별한 결과 검증 정확도 GC-MS, Orbitrap MS 등을 이용한 분석법이 국산과 외국산 모두 판별하여 추후 원산지 판별에 활용 가능성을 확인하였음.

2-3. 연구개발 성과

가. 연구성과 목표 및 대비실적

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	60 %													20 %	20 %					
최종목표	3	3		1							10			14	10		1			
1차연도	목 표 실 적																			
2차연도	목 표 실 적	1												3	2					
3차연도	목 표 실 적	1												3	3	1				
4차연도	목 표 실 적	1												4	4					
소계	목 표 실 적	2			1									7	12	10		1		
종료 1차연도	목 표 실 적	3			1									8	17	20	1			
종료 2차연도	목 표 실 적																			
종료 3차연도	목 표 실 적																			
종료 4차연도	목 표 실 적																			
소계	목 표 실 적	3	3		1									8	17	20	1			
합계	목 표 실 적	3	3		1									10	14	10	1	1		

나. 연구성과

(1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호	
1차년도										
2차년도	1	Discrimination and prediction of cultivation age and parts of <i>Panax ginseng</i> by Fouriertransform infrared spectroscopy combined with multivariate statistical analysis	PLos ONE	이병주 (제1 저자) 최형균 (교신저자)	12(10)	미국	Public Library Of Science	SCI	October, 2017	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186664
3차년도	2	Discrimination and prediction of the origin of Chinese and Korean soybeans using Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) with multivariate statistical analysis	PLos ONE	이병주 (제1 저자) 최형균 (교신저자)	13(4)	미국	Public Library Of Science	SCI	April, 2018	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196315
4차년도	3	Comparison of Volatile and Nonvolatile Compounds in Rice Fermented by Different Lactic Acid Bacteria	Molecules	이상미 (제1 저자) 김영석 (교신저자)	24(6)	기타	Molecular Diversity Preservation International	SCI	March, 2019	https://doi.org/10.3390/molecules24061183
	4	Highly geographical specificity of metabolomic traits among Korean domestic soybeans (<i>Glycine max</i>)	Food Research International	이은미 (제1 저자) 김영석, 이도엽 (교신저자)	120	캐나다	Canadian Institute of Food Science and Technology	SCI	June, 2019	https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.021
	5	Quorum sensing-independent cellulase-sensitive pellicle formation is critical for colonization of <i>Burkholderia glumae</i> in rice plants	Frontiers in Microbiology	곽기영 (제1 저자) 김진우, 황인규 (교신저자)	10	기타	Frontiers in Microbiology	SCI	January, 2020	https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03090
	6	NMR-based metabolic profiling discriminates the geographical origin of raw sesame seeds	Food Control	김석영 (제1 저자) 최형균 (교신저자)	112	영국	Elsevier	SCI	January, 2020	https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107113
	7	Discrimination of Cultivated Regions of Soybeans (<i>Glycine max</i>) Based on Multivariate Data Analysis of Volatile Metabolite Profiles	Molecules	김소연 (제1 저자) 최형균, 김영석 (교신저자)	25	기타	Molecular Diversity Preservation International	SCI	February, 2020	https://doi.org/10.3390/molecules25030763
	8	Discovery study of integrative metabolic profiles of sesame seeds cultivated in different countries	LWT-Food science and Technology	이보미 (제1 저자) 김영석, 이도엽 (교신저자)	129	영국	Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie.	SCI	April, 2020	https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109454

(2) 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호	C-06-02	
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Metabolomics	김소영	2017. 6. 29	브리즈번	호주
2	한국미생물공학회	이은미	2017. 6. 29	부산 BEXCO	대한민국
3	2017 질량분석학회	이은미	2017. 8. 24	제주 ICC	대한민국
4	한국대사체학회	이보미	2018. 4. 5	서울	대한민국
5	Metabolomics	이은미	2018. 6. 24	시애틀	대한민국
6	한국질량분석학회	이은미	2018. 8. 23	창원	대한민국
7	한국식품영양과학회	이은미	2018. 10. 31	부산	대한민국
8	한국대사체학회	김소연	2019. 4. 4	서울	대한민국
9	한국대사체학회	한아라	2019. 4. 4	서울	대한민국
10	한국대사체학회	이보미	2019. 4. 4	서울	대한민국
11	한국대사체학회	이은미	2019. 4. 4	서울	대한민국
12	한국대사체학회	김석영	2019. 4. 4	서울	대한민국
13	한국미생물생명공학회	전병관	2019. 6. 23	제주	대한민국
14	한국미생물생명공학회	최지은	2019. 6. 23	제주	대한민국
15	Metabolomics	이보미	2019. 6. 23	덴하그	네덜란드
16	한국식품과학회	이은미	2019. 6. 26	인천	대한민국
17	한국질량분석학회	이보미	2019. 8. 28	광주	대한민국

(3) 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	대두의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법	대한민국	이화여대 산단	2017. 10.16	10-2017 -0134118				100
2	대두의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법	대한민국	이화여대 산단	2016. 06.30	10-2018 -0139839				100
3	참깨의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법	대한민국	이화여대 산단/국민 대산단/ 중앙대산단	2016. 06.30	10-2019 -0062507				100

(4) 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	학사/석사/ 박사	2016												
2	학사/석사/ 박사	2017		2				2	2					
3	전문가채용	2017		1			1		1					
4	학사/석사/ 박사	2018	1	5			2	4	6					
5	학사/석사/ 박사	2019	1	4	2		1	6	6	1				
6	학사/석사/ 박사	2020		4			1	3						

(5) 기타

▶ **홍보**

: 식품저널 인터넷식품신문 foodnews 기사 (2017. 3. 14)

- 국립농산물품질관리원 연구 수행 (원산지 판별 과제 관련)

PLos ONE (2019. 12. 04)

- 2018년 가장 많이 인용된 PLos ONE 논문으로 선정 (상위 10%)

▶ **타 연구 활용**

- 대사체 해석 (이화여자대학교):

◦ 통합 데이터베이스 구축 방법 및 원산지 시료 분석 방법 활용

◦ 농산물 (대두, 참깨, 쌀) 데이터베이스 활용

과제명 : 발효식품의 향미특성, 품질 및 안전성에 관여하는 알데히드류의 최적 프로파일링 확보 및 제어를 위한 생성 및 전환에 관한 통합적 규명, 한국연구재단 기관, 2019.03.01.~2020.02.19

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 달성도

가. 최종 목표

○ 대사체 지문 및 미생물 군집 분석 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용
- 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립
- 농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 (농산물 3종: 대두, 참깨, 쌀) 및 네트워크 구축
- 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수(환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명
- 농산물 원산지 단속에 실제 활용
- 대상 농산물의 원산지별 시료로부터 미생물 군집 분석을 위한 인프라 연구
- 원산지별 농산물 시료의 미생물 메타지노믹스 해독 및 분석
- 원산지별 미생물 군집의 변이 비교 분석 및 차별화된 미생물 군집 탐색
- 원산지 판별 가능한 미생물군 활용한 바이오 마커 발굴 및 적용성 시험

나. 세부연구목표 및 달성도

연구개발 최종 목표	세부연구목표	달성도 (%)
대사체 지문 및 미생물 군 집 분석 기반 농산물 원산 지 판별법 및 플랫폼 구축 과 현장 적용	농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립	100
	농산물 원산지 판별을 위한 통합 데이터베이스 및 네트워크 구축	100
	원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수(환경요인, 유전요인 등)와의 상관관계 규명	100
	농산물 원산지 단속에 실제 활용	100
	대상 농산물의 원산지별 시료로부터 미생물 군집 분석을 위한 인프라 연구	100
	원산지별 농산물 시료의 미생물 메타지노믹스 해독 및 분석	100
	원산지별 미생물 군집의 변이 비교 분석 및 차별화된 미생물 군집 탐색	100
	원산지 판별 가능한 미생물군 활용한 바이오 마커 발굴 및 적용성 시험	100

다. 연차별 목표 및 달성도

(1) 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
1차 년도 (2016)	(주관) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 데이터 통합관리	원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상선정	- 원산지 판별 필요한 농산물 현황 조사 및 4차년도까지 사 용할 대상선정	- 국내 농산물 현황 조사 ·농산물품질관리원 자체 실시: 수요조사, 원산지 위변조 사례, 국내 생산/유통/수입되는 각 농산물 총량 - 대두, 참깨, 쌀 3가지 시료 선정	100
		대두의 대사체 분석법 확립	- 대두시료의 휘발성 대사체 최적 추출법 및 분석법 연구 - 대두시료의 휘발성 대사체 정성 및 정 량 분석	- 휘발성 대사체 최적 추출법 및 분석법 연구를 위한 정성/정량 분석 ·SPME: 250RPM, 40℃, 60분간 평형 20분간 흡착 230℃, 5분 탈착 ·GC/MS: 40℃ (6분) → 4℃/min → 200℃ (5분) - 대두(백태) 시료 6가지 전처리 방법 이용 ·Raw soybean ·Ground soybean ·Soybean slurry ·Using calcium chloride ·Ground soybean in distilled water ·Freeze grinding and using calcium chloride	100
	(공동1) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 검증모델 구축	이차대사산물 고속 확보방법 최적화	- 대두시료로부터 기 초대사화합물 추출 을 위한 유기용매 추출법 개발 - 대두시료로부터 이 차대사화합물 추출 을 위한 유기용매 추출법 개발 - 기초대사화합물/이차	- 총 6개의 반복실험을 통한 대 두시료 동결건조 시간 검증 (24시간) - 동결건조 된 대두시료의 grinding을 통한 미세분말 획 득(20초) - Isopropanol:MeOH:H ₂ O (3:3:2) 추출용매구성 및 구성비 최적 화	100

		대사산물 동시다발적 추출을 위한 추출법 개발		
	농산물 시료에 최적화된 액체크로마토그래피 이온 질량분석 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 기초대사화합물 분리능 최적화를 위한 gas chromatography parameter 최적화 - 이차대사산물 분리능 최적화를 위한 liquid chromatography parameter 최적화 - Time-of-flight 질량 분석법 최적화 - Orbitrap 질량분석법 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - Gas chromatography ·분석시간: 30 min ·유도체화법 검증 (methoxyamination and trimethylsilylation) - Reverse phase HPLC 컬럼 선정 ·C18 컬럼 ·분석시간: 16 min - HILIC 컬럼 및 조건 선정 ·HILIC column ·분석시간: 20 min 	100
	LC-MS raw data process 개발 및 DB 인프라 구축	<ul style="list-style-type: none"> - LC-MS 분석 후 data process 방법 구축 - 통계분석을 위한 post data process 방법 최적화 - 바이오마터 동정을 위한 주요 대사체 library 탐색 및 기반구축 	<ul style="list-style-type: none"> - High accuracy MS analysis 분석환경에서의 SEIVE를 이용한 고효율 data process 검증 - Orbitrap MS의 tandem mass-spectrum 특화 DB인 MZ cloud와 범용적 HMDB의 연계적 운영의 효율성 검증 	100
(공동2) NMR 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석	주요 농산물인 쌀의 원산지 판별을 위한 쌀겨의 예비 data 확보	<ul style="list-style-type: none"> - NMR기반 농산물(쌀겨) 유래 대사체 분석을 위한 시료 추출법의 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - 농산물(쌀겨) 시료 전처리 및 추출법 확립 	100
	농산물(쌀겨)의 1, 2차 대사체 추출법 및 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 농산물(쌀겨) 유래 대사체 분석을 위한 NMR 기기조건 및 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - NMR 가동조건 확립 	100
	농산물(쌀겨)의 1, 2차 대사체 정성분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 농산물(쌀겨)를 ^1H NMR (600MHz) 로 분석 결과 총 21개의 대사체 검출 - ^1H-^1H COSY 스펙트럼으로 1D NMR에서 검출된 대사체들의 정성분석의 신뢰성 높임 - 농산물(쌀겨) sample에 대한 대사체들의 ^1H NMR chemical shifts (δ) 및 splitting pattern을 나타냄 	100

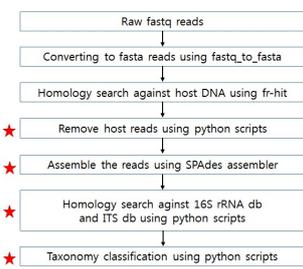
<p>(위탁) 농산물 시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용</p>	<p>원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상선정, 시료 구입 및 시료 확보</p>	<p>- 시료 선정은 본인 자체적으로 실시한 수요조사, 원산지 위변조 사례 및 국내 생산/유통/수입되는 각 농산물 총량(농림축산식품부 통계자료, 식물검역 통계자료, 관세청 통계자료 참조) 등을 근거로 1차적으로 <u>대두, 참깨, 쌀</u> 등을 선정함.</p>	<p>- 콩 시료를 수집 · 총 68점(국산 15개 지역 17점 / 수입산 5개 국가 51점) - 주관기관 및 협동기관에 시료 송부함</p>	<p>100</p>
<p>(협동) 미생물 군집 프로파일링을 활용한 원산지 판별용 마커 발굴</p>	<p>원산지 판별 대상 농산물 작물의 미생물 군집(community)관련 현황조사</p>	<p>- 대상 농산물 정보 조사</p>	<p>- 국립농산물품질관리원의 수요 조사와 통계청의 농산물 총량을 근거로 선정된 대상 농산물 (대두, 참깨, 쌀)의 원산지 식별정보 조사</p>	<p>100</p>
	<p>대상 농산물별 병원균 조사</p>	<p>- 작물별 세균, 진균, 내생균으로 병해 및 관련 병원균 조사 · 대두(13종 병해) · 참깨(7종 병해) · 쌀(11종 병해)</p>	<p>100</p>	
	<p>대상 농산물로부터 미생물 DNA 추출법 확립</p>	<p>- 시료 전처리법 개선 - DNA 추출법 조사 - 미생물 DNA 추출법 비교</p>	<p>- 시료 전처리법 : 동결건조법과 PBS 전처리법 비교 - Kit : PowerSoil Kit 와 PowerFood Kit 성능 비교</p>	<p>100</p>
	<p>대상 농산물 연관 미생물 군에 대한 유전체 정보 수집</p>	<p>- 농산물별 병원균 유전체 정보 수집</p>	<p>- 작물별 병원균에 대한 유전체 DB 정보 (assembly, bioproject, biosample, clone, genome, Nucleotide 등)를 NCBI로부터 수집</p>	<p>100</p>
	<p>메타지노믹스 활용 효율적인 바이오마커 발굴을 위한 프로그램 개발 정보 수집</p>	<p>- 미생물 군집 데이터 프로세싱 정보 수집</p>	<p>- 인간의 질병을 위한 마커 발굴을 위한 프로그램 개발과 대상 질병의 특이한 SNP를 발견하는 내용이 주를 이룸. - 원산지를 판별할 수 있는 특정 미생물군에서 특이 유전자를 탐색하여 바이오마커로 활용 가능성을 모색하는 연구는 미비함.</p>	<p>100</p>

(2) 2차년도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
2차 년도 (2017)	(주관) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 데이터 통합관리	원산지에 따른 대상 농산물 대두의 대사체 지문 분석	- 대두 전처리에 따른 특성 비교 - 국내, 중국, 북미산 대두로부터 휘발성 대사체 추출 - 휘발성 대사체 정성 및 정량 분석	- 대사체 분석을 위한 5가지 전처리 방법 비교 분석 - 국내 17개, 중국 13개, 북미 6개 지역 대두 이용 - 휘발성 대사체 추출법 및 분석법 · 휘발성 대사체 추출법 : Solid-phase micro extraction (SPME), -80℃에서 5분 간 cryo-focusing · 휘발성 대사체 분석: GC/MS 이용 - 휘발성 대사체 정성 및 정량: 라이브리리 및 내부표준물질로 정량 및 정성	100
		대두의 원산지 판별용 바이오마커 구명	- 다변량 통계분석 (PLS-DA)을 이용하 여 원산지 판별에 기여하는 휘발성 대 사체 확인	- 국내산, 중국산, 북미산 대두 는 PLS-DA에서 PLS component 1, 2에 의해 구분 가능	100
	(공동1) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체	1차년도 대상 농산물 대두시료의 1, 2차 분석을 통한 연도별 대사체 유동성 연구	- 대두시료의 원산지 1차 2차 연도 데이터 연계분석 및 상호비교 - 대두시료의 원산지 비특이적 연도 영향	- 다년간의 획득한 샘플의 포괄적 대사체 유동성 분석을 개별적 단별량분석을 통해 시행. - 또한 통합적 모델구축을 위하여 ANOVA-simultaneous	100

			인자 발굴	component analysis (ASCA) 분석 플랫폼을 구축	
		대두 시료의 대사체표현형 확보 및 다변량 모델구축	- 원산지 특이적 바이오마커를 제시하기 위하여 다양한 통계기법을 사용	- 다변량 주성분 분석기법(Principal component analysis, PCA)와 직교부분최소자승판별 분석(OPLS-DA, Orthogonal partial least squares-discriminant analysis)를 통하여 그룹간의 프로파일을 수행 및 바이오마커 인자를 도출	100
	분석 및 검증모델 구축	LC-MS 질량분석법을 이용한 대두시료내 이차대사산물 검출 및 기능성물질 탐색	- 고분해능 UPLC와 highest resolution and sensitivity능을 보유한 Orbitrap mass spectrometry platform을 적용하여 이차대사산물 분석 - 대두시료내 존재하는 대표물질 및 기능성물질 표준물질 확보 및 LC-MS 검출 최적화	- high quality 질량분석결과를 획득하였으며, 높은 reproducibility와 다양한 종류의 이차대사산물 프로파일을 획득 - 대두시료 대표물질이 특이적 scan mode의 필요성없이 full mass scan mode로 검출되는 것을 확인. 추후 포괄적 이차대사산물의 프로파일링과 동시에 수행할 수 있는 기법확립	100
		대두시료의 기초대사화합물/이차대사산물 통합적 데이터분석 플랫폼 구축	- GC-MS를 통해 획득한 primary metabolite profiles과 LC-MS를 통해 검출된 secondary metabolite profiles의 연계분석을 위한 data process 방법확립	- regularized canonical correlation analysis (rCCA) 알고리즘을 이용한 멀티플랫폼 질량분석 데이터 integration - Two-way orthogonal partial least square 알고리즘을 이용한 멀티플랫폼 질량분석 데이터 통합 프로세스 확립	100

	대두의 1, 2차 대사체 추출법 및 분석법 확립.	- 다양한 추출용매를 이용한 최적 추출법 확립	- 대두 시료 전처리 및 추출법 확립	100
		- 대사체 분석을 위한 NMR 기기조건 및 분석법 확립	- NMR 기기조건 및 분석법 확립	100
	대두의 1, 2차 대사체 정성 및 정량 분석법 확립	- ¹ H NMR, HSQC, COSY를 활용한 대사체 identification 방법 확립	- 대두시료를 ¹ H NMR(600MHz)로 분석 결과 25개의 대사체가 검출됨 - ¹ H- ¹ H COSY, ¹ H- ¹³ C HSQC spectrum으로 ¹ H NMR에서 검출된 대사체들의 정성분석의 신뢰성을 높임 - 대두 시료에 대한 대사체들의 ¹ H NMR chemical shifts (δ) 및 splitting pattern을 나타냄	100
대두의 원산지 판별용 바이오마커규명 및 NMR 기반 대사체 DB확보	- 다변량 통계분석을 활용한 원산지 판별용 NMR 대사체 DB 확립	- 다변량 통계분석을 이용하여 국가 내, 국가 간 원산지 판별을 위한 바이오마커 DB 구축	100	
(위탁) 농산물 시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용	원산지 판별 대상 농산물의 시료 구입 및 시료 확보	- 원산지 판별 대상 농산물로 선정된 대두, 참깨, 쌀 등에 대한 시료 수집 - 도별 지역별로 다양한 시료 수집	- 콩 추가 시료를 수집 - 총 21점(국산 9개 도, 19개 지역, 21점) - 주관기관 및 협동기관에 시료 송부함	100
(협동) 미생물 균집 프로파일링을 활용한 원산지 판별용 마커 발굴	메타지놈 시퀀싱을 위한 미생물 total DNA 추출법 확립	- 시료 전처리법 비교 분석 및 준비방법 확립 - 미생물 DNA 추출법 확립	- 대두시료 수집 (주관 기관 제공) : 국내(17개) / 중국(13) / 미국(7) 수집 - 대두 gDNA 혼입방지를 위한 시료 전처리법 비교 (분쇄 / 껍질분리 / PBS 침지) - 미생물 DNA 추출법 확립 : (PBS buffer 여과법 + Powersoil kit) 미생물 gDNA 추출 국내6개 시료 (전남, 경북, 충청, 강원, 경남, 전북) 중국 3개 시료 (흑룡강성, 산둥성, 광둥성), 미국 1개 시료 (일리노이)	100
	메타지놈 시퀀스	- NGS 기법에 의한	- 국내산 시료와 중국산 시료	100

		<p>데이터 생산, 분석 및 가공</p>	<p>유전체 정보 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 정보 활용 - 1차군집 분석 - 원산지별 차별화 - 미생물 군집 필터링 	<p>대상으로 illumina MiSeq 플랫폼을 이용하여 NGS 시퀀싱으로 유전체 정보 생성 : 진균 (ITS2), 세균 (16S rRNA) 대상</p> <p>세균 16S rRNA : ·국내산 (154,146reads) ·중국산 (145,131 reads)</p> <p>진균 ITS : ·국내산 (135,562 reads) ·중국산 (134,393 reads)</p>	
	<p>메타지놈 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 tool을 활용한 분류 및 phylogenetic tree 분석 - 기존 tool을 이용해서 분석한 taxonomy와 phylogenetic tree 데이터와 문제점을 보완 		<p>100</p>	
	<p>메타지놈 프로파일링 결과로부터 차별화되는 미생물 군의 필터링 방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 원산지별 미생물 군집의 정량, 정성적 분석을 통한 상이한 미생물 군집 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 대두의 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석 : ·국내산 : <i>Pantoea vagans</i>가 91.4%로 대부분 존재하고 <i>Pseudomonas coleopterorum</i> (5.4%), <i>Pseudomonas cichorii</i> (2.0%)가 다음으로 존재 ·중국산 : <i>Erwinia rhapontici</i> (24.5%), <i>Rhodoligotrophos appendicifer</i> (16.6%), <i>Pseudomonas coleopterorum</i> (14.6%) 우점종으로 존재 - 대두의 진균 ITS 미생물 군집 분석: ·국내산 : <i>Aspergillus vitricola</i> (49.8%)와 <i>Cladosporium welwitschiicola</i> (28.3%)로 우점함 ·중국산 : <i>Boeremia foveata</i> (37.2%), <i>Cladosporium welwitschiicola</i> (16.5%), <i>Cercospora cyperina</i> (10.4%)로 우점함 	<p>100</p>	

(3) 3차년도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
3차 년도 (2018)	(주관) MS 기반 대사체학 을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 데이터 통합관리	원산지에 따른 대상 농산물 참깨의 대사체 지문 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 참깨 전처리 조건 및 분석 방법에 따른 특성비교 - 국내산, 수입산 참깨로부터 휘발성 대사체 추출 - 휘발성 대사체 정성 및 정량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 대사체 분석을 위한 전처리 조건 및 분석 방법 비교 - SPME fiber : DVB/CAR/PDMS, PDMS roasting temp. : 40°C, 100°C, 150°C, 180°C, 23분 - split mode : splitless, split 10:1, cryo-focusing : -80°C, 5분 - 시료 : 국내 27개, 수입 12개 지역 참깨 - 휘발성 대사체 추출법 선정 : solid phase micro-extraction (SPME) - GC/MS 분석 : column, injector temp., oven temp., scan range, scan rate, ionization energy, split 비율 등 확립 - 휘발성 대사체 정성 및 정량 : 라이브러리 및 내부표준물질을 활용한 정량 및 정성 분석에서 추출방법, roasting 온도, 분석방법, 수분 조건에 따른 휘발성 대사체의 차이를 확인함 	100
		참깨의 원산지 판별용 바이오마커 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다변량 통계분석 (PLS-DA)을 이용하여 원산지 판별에 기여하는 휘발성 대사체 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산, 수입산 참깨는 PLS-DA에서 PLS component 1, 2에 의해 구분 가능 (alcohol류 1개, aldehyde류 6개, furan류 1개, hydrocarbon류 2개, ketone류 2개, phenol류 1개 등) 	100
		연구팀 간 교차 검증 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 서로 다른 플랫폼간의 정량 데이터 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 서로 다른 분석기기 (GC-TOF/MS 및 LC-MS)에서 얻은 주요 대사체 정량값 및 	100

				<ul style="list-style-type: none"> 결과분포 비교 분석 - 대두 시료 GW, GB, JB 시료군의 평균값 및 표준편차 확인 - Categ. Box & Whisker plot 활용 	
(공통1) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 검증모델 구축	대두시료의 3차 분석을 통한 연도별 특징규명 및 원산지 특이적 지표 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - LC-MS를 이용한 대두시료의 이차대사산물 3차 연도 분석 - 대두시료의 1차, 2차, 3차 연계분석을 통한 연도 독립적 대사체 단일 인자 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - LC-MS를 이용한 3차 연도 분석 (분석 방법 1차, 2차 method 사용) - 1차, 2차, 3차 획득한 샘플의 포괄적 연계분석을 통한 대사체 유동성 분석 시행. - Statistica를 통한 원산지 판별 인자 선별 및 구축을 위한 연도 독립적 대사체 마커 (군) 선별, 최종모델 선정 및 선별 대사체 군을 검증. - 대두 시료의 원산지-연도 상호작용 인자 규명을 통한 원산지 구별 독립 인자 발굴 (multi-ANOVA) - 대두 시료의 1차, 2차, 3차 통합적 다변량분석-ANOVA 복합 모델 분석을 통한 multi-panel 지표제시 	100	
	참개시료의 다중질량분석시스템(GC-MS, LC-MS) 및 NMR 데이터 연계 프로세스 개발 및 적용	<ul style="list-style-type: none"> - 질량분석시스템간 연계 데이터 프로세스 개발 (GC-MS, LC-MS) 및 적용 (대두시료, 참개시료) 	<ul style="list-style-type: none"> - 분석시스템간 통합적 데이터 프로세스 개발 (질량분석기-NMR) - 대두 시료, 참개 시료의 질량 분석기기 통합적 대사체 모델 확립 및 산지 특징적 지표 발굴 - 단변량 통계 분석 (univariate statistics), SAM (significance analysis for microarrays), unsupervised multivariate statistics, supervised multivariate statistics 분석, ROC (receiver operating characteristic) curve 분석 및 데이터 프로세스 	100	
	참개시료의 LC-MS 분석을 통한	- 참개시료의 LC-MS 분석을 통한 이차	- 참개시료에 존재하는 대사체 (metabolic features)의 정량적	100	

		이차대사산물 연구 및 원산지별 인자 발굴	대사산물 연구 및 원산지별 인자 발굴	<p>DB 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - LC-MS 분석을 통해 참깨의 이차대사산물 및 기능성 대사산물의 표적물질 프로파일링 플랫폼을 구축과 이온화 방법, 원산지별 인자 발굴 및 구체적인 질량분석 parameter를 optimization - 표적/비표적 대사물질 프로파일링을 통한 참깨 시료 분석 시행 - 참깨시료에 존재하는 주요 대사체 선별적 동정 및 정성적 DB 구축 	
(공동2) NMR 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석		원산지에 따른 대상 농산물 참깨의 NMR 기반 대사체 지문 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 다변량 통계분석을 활용한 원산지 판별용 FT-IR 및 NMR 대사체 DB 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - NMR 기반 농산물 참깨 대사체 DB확립 - 다변량 통계분석을 활용하여 한국과 중국산 참깨의 대사체 분리모델 및 분리 바이오마커 제시 - NMR 기반 한국과 중국산 참깨의 원산지 판별 주요 대사체 마커선정 : valerate, isoleucine, leucine, valine, threonine, alanine, acetate, proline, malate, succinate, asparagine, choline, betaine, glucose, xylose, glycine, ascorbate, sucrose, arabinose, uridine, tyrosine, gallate, phenylalanine 및 tryptophan 총 24개로 나타남 	100
		참깨의 원산지 판별용 바이오마커 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다변량 통계분석을 활용한 원산지 판별용 FT-IR 및 NMR 대사체 바이오마커 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - NMR 기반 한국과 중국산 참깨의 원산지 판별을 위해 normalization, scaling method 및 component 수 탐색 : total normalization, pareto scaling, 5 component일 때, 최적의 분리를 확인함 - VIP cut-off value 1.0이상인 6개의 대사체가 잠재적 바이오 마커 후보로 선정됨 	100
(위탁) 농산물	국내 원산지 판별 대상 농산물 선정, 시료 구입	원산지 판별 대상 농산물로 선정된	원산지 판별 대상 농산물로 선정된	참깨 시료 수집 총 38점 (국산 9개 도, 33개 지역,	100

(협동) 미생물 군집 프로파일 링을 활용한 원산지 판별용 마커 발굴	시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용	및 시료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 대두, 참깨, 쌀 등 에 대한 시료 수집 - 도별 지역별로 다 양한 시료 수집 	<p>38점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 콩 시료 수집 총 18점 (국산 8개 도, 17개 지역, 18점) - 주관기관 및 협동기관에 시료 송부함 	
		메타지놈 시퀀싱을 위한 미생물 total DNA 추출법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 시료 전처리법 비교 분석 및 준비방법 확립 - 미생물 DNA 추출법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 참깨시료 수집 (주관 기관 제 공) : 국내 (44개) / 중국 (6) / 해외 (6) 수집 (국내 6개 구입) - 참깨 gDNA 혼입방지를 위한 시료 전처리법 비교 (참깨시료 50, 100 g/ PBS buffer 200, 400 mL) - 미생물 DNA 추출법 확립 : PBS buffer 여과법 + Powersoil kit - 미생물 total DNA 추출 (56개 시료) : 국내 44개 (경기, 강원, 충남, 충북, 전남, 전북, 경남, 경북, 제주) 중국 6개 (흑룡강 성, 길림성, 하남성, 안휘성, 운남성, 광서장족자치구), 기타 해외 (에디오피아, 나이지리아 (2), 파키스탄, 인도) 	100
	선택 배지 활용한 상이한 미생물 (진균류) 군의 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 선택배지 DRBC 및 PDA 고체평면배지를 활용 하여 진균류 분리 	<ul style="list-style-type: none"> - 참깨로부터 미생물을 분리하 기 위하여 전처리 (참깨 50g/200 mL PBS buffer) 현탁 액 50uL를 원액, 100배 희석, 1000배 희석하여 선택배지 DRBC 고체 평면배지에 도말 하여 확인 - Metagenome sequencing결과로 부터 유의미한 미생물 확인 후 배양조건에서의 분리 및 동정을 위한 전처리 (참깨 50g/200 mL PBS buffer) 현탁액 을 -80℃ 초저온 냉동고에 보관 	100	
메타지놈 시퀀스 데이터 생산, 분석 및 가공	<ul style="list-style-type: none"> - NGS 기법에 의한 유전체 정보 생산 - 유전체 정보 활용 1차군집 분석 - 원산지별 차별화 미생물 군집 필터링 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산 시료와 중국시료 대상 Illumina MiSeq 이용한 NGS 시퀀싱 정보생산 : 진균 (ITS2), 세균 (16S rRNA) 대상 - 세균 16S rRNA : 국내산 25개, 중국산 6개, 기타 해외산 5개 등 총 36개의 시료에서 총 	100		

				<p>6,187,299쌍의 paired-end reads 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 진균 ITS : 국내산 25개, 중국산 6개, 기타 해외산 5개 등 총 36개 시료에서 4,748,564 쌍의 paired-end reads 생산 	
		<p>메타지놈 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 분석 및 필터링 방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 분석 tool을 활용한 분류 및 phylogenetic tree 분석 - 기존 분석 tool 활용 시 문제점 보완 	<ul style="list-style-type: none"> - 참가의 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석 : <i>Pantoea</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Enterobacter</i> 등에 속하는 일부 세균 1~2종이 대부분의 비율로 존재하는데, 시료간 편차가 심함 - 참가의 진균 ITS 미생물 군집 분석: 국내산은 <i>Alternaria</i> 속이 주로 분포하는 시료들이 많고 <i>Filobasidium</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Macrophomina</i>, <i>Aspergillus</i> 속에 속하는 곰팡이들의 비율이 높은 시료들도 존재함 중국산은 <i>Aspergillus</i> 속의 미생물 비율이 높은게 많음. 아프리카산은 <i>Macrophomina</i>와 <i>Alternaria</i>가 비슷한 비율로 존재하는 경향이 있고, 인도산은 <i>Macrophomina</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Alternaria</i>가 파키스탄산은 <i>Cladosporium</i>이 가장 많이 존재하는 등 국가간 경향성 차이가 어느 정도 보임 	<p>100</p>

(4) 4차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
4차 년도 (2019)	(주관) MS 기반 대사체학 을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 데이터 통합관리	원산지에 따른 대상 농산물 쌀의 대사체 지문 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상 선정 - 쌀 전처리 조건에 따른 특성비교 - 국내산, 수입산 참깨로부터 휘발성 대사체 추출 - 휘발성 대사체 정성 및 정량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 대사체 분석을 위한 전처리 조건 및 분석 방법 비교 - 전처리 방법 : Raw, Ground, Cooked rice boiling temp. : 50°C, 60°C, 80°C, 20분 - split mode : splitless, split 10:1, cryo-focusing : -80°C, 5분 - 시료 : 백미 : 국내 30개, 수입 5개 지역, 현미 : 국내 14개, 수입 15개 지역 - 휘발성 대사체 추출법 선정 : solid phase micro-extraction (SPME) - GC/MS 분석 : column, injector temp., oven temp., scan range, scan rate, ionization energy, split 비율 등 확립 - 휘발성 대사체 정성 및 정량 : 라이브러리 및 내부표준물질을 활용한 정량 및 정성 분석에서 추출방법, boiling 온도, 전처리 방법, 분석 방법에 따른 휘발성 대사체의 차이를 확인함 	100
		쌀의 원산지 판별용 바이오 마커 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다변량 통계분석 (PLS-DA)을 이용하여 원산지 판별에 기여하는 휘발성 대사체 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산, 수입산 백미는 OPLS-DA에서 OPLS component 1에 의해 구분 가능 (alcohol류 1개, aldehyde류 1개, ester류 1개, hydrocarbons 9개, ketone류 1개) - 국내산, 수입산 현미는 PLS-DA에서 PLS component 1에 의해 구분 가능 	100

				(alcohol류 5개, aldehyde류 9개, ester류 10개, ketone류 1개, furan 계열 1개, hydrocarbon류 9개)	
		원산지 검증 모델 수립	<ul style="list-style-type: none"> - ROC curve analysis를 통해 검증 모델 정확성 확인 - 다른 통계 software를 이용하여 선정된 바이오마커의 원산지 판별 정확도 산출 	<ul style="list-style-type: none"> - 농산물 (대두, 참깨, 쌀) 에 대해 수립한 검증 모델은 ROC curve analysis를 통해 AUC value가 모두 0.98이상으로 높은 정확도 보임 - 선정된 바이오마커를 적용했을때, 모든 농산물(대두, 참깨, 쌀)에 대해 원산지 판별 정확도는 100%로 확인됨. 	100
(공동1) MS 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석 및 검증모델 구축	쌀시료의 분석기기 통합적 대사체 모델 확립 및 원산지 구별 지표검증	<ul style="list-style-type: none"> - 쌀 시료의 GC - MS , LC-MS, NMR 연계적 데이터 분석을 통한 통합적 원산지 단일지표 도출 - 쌀 시료의 산지특이적 다중인자 대사체 예측모델 구축 (predictive model) 	<ul style="list-style-type: none"> - GC-MS 및 LC-MS 후 대사체 Identification - 국내산, 중국산 백미의 (PLS-DA, ROC curve analysis, pattern search, pathway analysis)를 통하여 그룹간의 대사체 차이 확인 및 바이오마커 인자를 도출 	100	
	비생물학적 데이터 수집 및 농산물과의 대사체 상호작용 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 비생물학적 데이터 수집 및 농산물과의 대사체 상호작용 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 대두 지리적 및 기후 데이터 분석 및 토양 조직에 대한 조사 수행 (위도, 경도, 평균, 온도 및 총 강우량 포함) 	100	
(공동2) NMR 기반 대사체학을 이용한 농산물의 원산지 판별을 위한 대사체 분석	대상 농산물 쌀의 1, 2차 대사체 추출법 및 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 쌀 유래 대사체 분석을 위한 최적 추출법 확립 - 쌀 유래 대사체 분석을 위한 NMR 기기조건 및 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 쌀 시료 전처리 및 추출법 확립 - NMR, FT-IR 기기조건 및 분석법 확립 	100	
	농산물 쌀의 1, 2차 대사체 정성 및 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 identification 방법 	<ul style="list-style-type: none"> - 쌀을 ^1H NMR (600MHz) 로 분석 결과 총 24개의 대사체 검출 	100	

			<ul style="list-style-type: none"> - ^1H-^1H COSY 스펙트럼으로 1D NMR에서 검출된 대사체들의 정성분석의 신뢰성 높임 - 쌀 sample에 대한 대사체들의 ^1H NMR chemical shifts (δ) 및 splitting pattern을 나타냄 	
농산물 쌀의 원산지 판별용 바이오마커 규명		<ul style="list-style-type: none"> - 다변량통계분석을 이용한 쌀의 원산지 판별 바이오마커 선정 	<ul style="list-style-type: none"> - OPLS-DA모델설립에 필요한 최적의 데이터 처리조건을 확립함 (백미: total area normalization, UV scaling, 6 components/ 현미: standardized area normalization, UV scaling, 11 components) - Leave-one-out cross validation을 통한 쌀의 원산지 분리 정확도를 산출함 (백미 97.1%, 현미 98.9%) - VIP분석을 통해 VIP 1.0이상의 쌀 원산지 분리에 기여하는 잠재적 바이오마커를 선정함 [백미 11개 (succinate, pyruvate, methionine, alanine, sucrose, fumarate, glutamine, aspartate, glucose, glutamate, glycolate, 현미 5개 (choline, glucose, maltose, sucrose, acetate)] 	100
FT-IR기반 쌀의 원산지 판별모델 설립		<ul style="list-style-type: none"> - FT-IR분석을 통한 쌀 대사체 작용기 분석 및 원산지 판별모델 설립 	<ul style="list-style-type: none"> - FT-IR ATR mode에서 쌀시료 분석결과 N-H stretching (protein, amide A), CH and CH_2 aliphatic stretching group (lipid - carbohydrate), C=O stretching (protein, amide I), C—O (carbohydrate), C—O stretching C—O—C/C—O bending이 주요 작용기로 나타남 - 원산지 판별모델 설립을 위한 최적의 OPLS-DA 데이터 전처리 조건을 확립함 (vector 1차 normalization, pareto 	100

			scaling)	
	쌀의 NMR, FT-IR 기반 대사체 DB 확보	- 다변량 통계분석을 활용한 원산지 판별용 NMR 대사체 DB 확립	- 다변량 통계분석을 이용하여 국가 내, 국가 간 원산지 판별을 위한 바이오마커 DB 구축	100
(위탁) 농산물 시료 수집, 보관 및 원산지 단속에 적용	국내 원산지 판별 대상 농산물 현황 조사 및 대상선정, 시료 구입 및 시료 확보	- 원산지 판별 대상 농산물로 선정된 대두, 참깨, 쌀 등에 대한 시료 수집 - 도별 지역별로 다양한 시료 수집	- 쌀 시료 수집 총 16점 (국산 8개 도, 15개 지역, 16점) - 주관기관 및 협동기관에 시료 송부함	100
	농산물 원산지 단속에 실제 활용	- 원산지 검증을 위한 시료 수집 - 대사체 분석 기술을 이용한 원산지 검정	- 콩 시료 수집 총 12점 (국산 8개, 외국산 8개, 12점) - 휘발성 대사체를 이용한 원산지 판별 : 원산지 구별하는 바이오마커 적용하여 원산지 검정 검증 정확도 100% - 대사체 분석 기술을 이용한 원산지 판별 : 대사체를 이용한 콩 원산지 판별법 검증 검증 정확도 100%	100
(협동) 미생물 군집 프로파일 링을 활용한 원산지 판별용 마커 발굴	메타지놈 시퀀싱을 위한 미생물 total DNA 추출법 확립	- 시료 전처리법 비교 분석 및 준비방법 확립 - 미생물 DNA 추출법 확립	- 쌀시료 수집 (주관 기관 제공) : 국내 7개 지역 2품종 왕겨 (14), 현미(14), 백미(14) 42개 / 중국 15개 지역 현미(15), 백미(15) 30개 수집 - 쌀 gDNA 혼입방지를 위한 시료 전처리법 비교 (각 왕겨, 현미, 백미 시료 50g/ PBS buffer 200, 400 mL) - 미생물 DNA 추출법 확립 : PBS buffer 여과법 + Powersoil kit - 미생물 total DNA 추출 (34개 시료) : 국내 왕겨 14개 (경기, 강원, 충북, 전북, 경남, 경북), 국내 현미 6개 , 백미 3개 , 중국 현미 8개 , 백미 3개 (헤이룽장성, 허난성, 장쑤성, 랴오닝성, 산둥성, 산시성, 후베이성, 쓰촨성)	100

		<p>메타지놈 시퀀스 데이터 생산, 분석 및 가공</p>	<ul style="list-style-type: none"> - NGS 기법에 의한 유전체 정보 생산 - 유전체 정보 활용 1차군집 분석 - 원산지별 차별화 미생물 군집 필터링 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산 쌀시료와 중국 쌀시료 대상 Illumina MiSeq 이용한 NGS 시퀀싱 정보생산 : 진균 (ITS), 세균 (16S rRNA) 대상 - 세균 16S rRNA : 국내산 왕겨 14개 시료에서 총 120,000 ~ 150,000쌍의 paired-end reads 생산 - 진균 ITS : 국내산 황겨 14개, 현미 6개, 백미 3개, 중국산 현미 8개, 백미 3개 총 36개 시료에서 130,000 ~ 230,000쌍의 paired-end reads 생산 	100
		<p>메타지놈 시퀀스 데이터 활용 미생물 군집 분석 및 필터링 방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 tool을 활용시 문제점 보완 - 기존 tool을 이용하여 분석한 taxonomy와 phylogenetic tree 데이터와 문제점을 보완 	<ul style="list-style-type: none"> - Lotus pipeline을 이용하여 분석 - 세균 16S rRNA 군집 분석 및 진균 ITS 군집 분석 : NCBI에서 새로 rRNA typestrains이 용하여 만든 prokaryotic_16S_rRNA DB와 ITS_RefSeq_Fungi DB를 이용하여 중등정 	100
		<p>메타지놈 프로파일링 결과로부터 차별화되는 미생물 군의 필터링 방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 원산지별 미생물 군집의 정량, 정성적 분석을 통한 상이한 미생물 군집 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 쌀의 세균 16S rRNA 미생물 군집 분석 : <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>, <i>Pantoea anthophila</i>, <i>Pantoea agglomerans</i>, <i>Paenibacillus bovis</i>, <i>Kosakonia cowanii</i> 등이 발견되는데, 시료마다 하나의 세균이 과점하는 경향이 보이고 오대벼와 일품벼간의 유의미한 차이도 보임 - 쌀의 진균 ITS 미생물 군집 분석 : <ul style="list-style-type: none"> ·국내산 왕겨와 현미에선 <i>Moesziomyces antarcticus</i>가 압도적인 비율로 우점하는 반면, 백미에선 <i>M. antarcticus</i>의 비율이 낮아지고 <i>Alternaria</i>나 <i>Epicoccum</i> 등 다른 곰팡이의 비율이 높아짐 ·중국산 헤이룽장, 쓰촨산을 	100

				<p>제외한 모든 현미와 백미에서 <i>Aspergillus brunneus</i>, <i>Naganishia diffuens</i>, <i>M. antarcticus</i> 중 하나가 압도적 비율로 과점함</p>	
			<p>- 원산지 판별 가능한 미생물 군집 바이오마커 후보군</p>	<p>- 16S rRNA 미생물 군집의 ANOVA 분석결과 통계적으로 유의미하다고 판별됨 ·참깨 : <i>Bacillus circulans</i>, <i>Sphingomonas roseiflava</i> ·벼 : <i>P. agglomerans</i> 등 4종</p> <p>- 진균 ITS 미생물 군집 ANOVA 분석결과 통계적으로 유의미하다고 판별됨 ·참깨 : <i>A. alstroemeriae</i> 등 7종 ·벼 : <i>M. antarcticus</i> 등 12종</p>	100

4. 연구결과의 활용 계획

4-1. 활용방안

(가) 확립된 연구 노하우를 위탁연구기관인 국립농산물품질관리원으로 기술이전 및 협동 기관의 기술지원을 통해, 연구 노하우와 제공된 데이터베이스를 활용하여 농산물 원산지 단속을 위한 과학적 원산지 판별 증빙에 활용하고자 함

(나) 본 연구에서 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문법 확립 기술은 지적 재산권 취득을 위해 출원 또는 준비 중이며, 향후 취득한 지적 재산권을 이용하여 본 연구 과제에서 개발한 분석 기술을 외부 기관에 기술 이전하여 원산지 모니터링 도구로 활용할 예정

(다) 연구 결과 및 분석 기술, 구축한 데이터베이스를 이용하여 다양한 국내외 농산물의 원산지 판별 방법의 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있으며, 향후 구축한 데이터베이스를 상용화 하여 외부 기관에 활용하고자 함

(라) 본 연구과제에서 개발된 대사체를 이용한 농산물 원산지 판별 방법은 농산물의 위, 변조를 방지함과 동시에 원산지를 판별할 수 있는 분석 기술이 개발되어 국내외 농산물의 판별에 과학적, 대사체학적 근거를 확보에 활용하고자 함

4-2. 기대성과

(가) 기술적 측면

- GC-MS, GC-TOF/MS, LC-MS, NMR, FT-IR을 이용한 대사체 지문법 확립하여 주요 결과를 국제 학술지에 게재하였으며, 농산물 원산지 판별 관련 추출, 분리 및 분석, 판별 기법 관련 응용 연구에 활용이 가능함.
- 다양한 분석 기기를 이용한 농산물 대사체 분석을 통해 원산지를 구별하는데 적용 가능한 바이오마커 정보를 확보하여 농산물 위변조 단속에 활용될 수 있음
- 본 연구에서 발굴된 바이오마커는 농산물 원산지 판별에 이용 가능하며, 국내 농산물 시장의 신뢰를 증진 시킬 것으로 기대되며, 관련 기술 교육 및 분석 키트의 개발 등 산업화에 활용 가능함.

(나) 경제·산업적 측면

- 농산물의 위변조를 방지함과 동시에 원산지를 명확하게 구별할 수 있는 분석 기술이 확립 되어 국내외 농산물의 판별에 과학적 근거를 확보함으로써 국내 농산물 시장 신뢰 확보와 국내 농산물의 경쟁력 강화에 크게 기여할 것이라 기대함
- 개발기술의 교육, 원산지 판별 통합 데이터베이스 제공 등을 통해 이와 관련된 전문 일자리 창출에 기여할 것임

- 본 연구에서 개발된 원산지 판별 기술은 농산물의 위, 변조 방지에 이용되어 생산자와 소비자의 권익이 보호될 것임 특히, 소비자들의 신뢰를 확보함으로써 국내 농산물 소비와 수출이 증대되어 관련 식품산업이 활성화 될 것이라 기대함

4-3. 활용 계획

(가) 특허분석 측면

국내 농산물 및 식품의 위변조 규모는 전체 시장 규모의 약 10% 정도 차지하는 것으로 농산물의 원산지를 판별하는 것은 국가적으로 중요한 문제로 대두되며, 과학적이고 객관적인 판별법 확보가 필요함. 기존 특허는 주로 유전체 정보를 활용한 단일염기다형성마커를 이용하여 판별하는 것으로 대사체를 이용한 원산지 판별에 대한 특허는 아직 이루어지지 않은 상태임. 본 연구과제에서는 농산물 내 전대사체를 untargeted인 방식으로 분석하여 국내에서 유통되는 농산물의 대사체 정보를 확보하고 이를 기반으로 바이오마커를 발굴하는 방향으로 연구를 추진하였음. 바이오마커 조성물을 포함하는 농산물의 원산지 판별용 키트를 제공 및 바이오 마커를 이용하여 원산지 판별하는 방법으로 3건의 특허 출원하였으며 등록할 예정임. 원산지 판별 기술 교육 및 분석 키트의 개발 등 산업화에 활용할 수 있도록 함.

(나) 논문분석 측면

본 연구과제에서는 국내 유통되는 농산물의 원산지 판별하기 위한 대사체 지문 분석법 확립과 판별에 핵심적으로 기여하는 바이오마커를 발굴하고 농산물 대사체 분석 및 통합 데이터 베이스 구축 방향으로 연구를 추진하였음. 국내에서 유통되는 국내 및 수입 농산물의 대사체 분석법 및 검정 모델 확립, 원산지 구별에 대한 논문을 게재하였음. 국내에서 생산되는 농산물 (대두)를 분석하여 지리적, 기후적 특성과의 연관성을 탐구하고 바이오마커 발굴에 대한 논문을 게재하였음. 식물 체내 세균의 정착에 중요한 역할을 하는 미생물과 농산물 (쌀)의 상관관계에 대한 논문을 게재하였음. 군집 분석과 다변량 통계분석에 기반한 국산, 수입산 참깨의 원산지 판별모델 설립 및 잠재적 바이오마커를 발굴하는 논문 게재예정임. 농산물 내 서식하는 미생물을 활용하여 특정 유전자를 마커로 활용하면 작물의 원산지 모니터링에 활용 가능함. 본 연구에서 정립한 농산물 대사체 분석 기술 및 다변량 데이터 분석 기술을 다양한 국내외 농산물의 원산지 판별 연구에 활용 가능하며 대사체 분석 기술과 다변량 데이터 분석 교육을 시행하여 대사체학 및 농수산식품 분석과 안전성 평가 분야의 전문연구인력 양성에 활용 가능함. 본 연구에서 정립한 농산물 원산지 판별법의 표준화를 통해 관련 연구 장비 및 분석 키트의 개발 및 산업화에 활용할 계획임.

(다) 시장분석 측면

- ① 본 연구과제에서는 위변조 사례와 국내 생산/유통/수입되는 양을 근거로 농산물을 선정하고 (대두, 참깨, 쌀), 농산물의 대사체 분석 방법을 확립하고 다양한 통계기법을 활용하여 원산

지 판별 바이오마커 발굴에 대한 기반 기술을 확보함

- ② 본 과제에서는 농산물 대사체와 농산물 내 대사체 생성과 환경적 요인들의 상관관계 규명 등 분석 기술을 접목하여 농산물의 원산지 판별 및 농산물들의 품질 개선에 적용시키는 방향으로 연구를 추진하여 다양한 분석기기 플랫폼에서 획득된 데이터의 연계분석이 가능한 시스템을 구축함
- ③ GC-MS, GC-TOF/MS, NMR 등 여러 분석기기를 이용한 통합 연구를 통해 다양한 농산물들의 원산지 판별에 대한 총체적인 연구 기술을 확보하였을 뿐 아니라, 구축된 통합 데이터베이스를 향후 지속적으로 축적 보강하여 이를 활용한 농산물 원산지 단속 및 품질 관리에 활용될 수 있음
- ④ 본 연구과제에서 다양한 분석기기를 통해 확립한 원산지 판별 기술을 검증하여 원산지 판별법의 정확성 및 현장 활용 가능성을 검토하고, 현장 활용 가능성 검토 결과를 토대로 원산지 단속에 적용할 예정임
- ⑤ 농산물 원산지 판별법의 활용을 통해 원산지를 속여 파는 상행위를 근절하는 것뿐만 아니라, 농산물 유통질서를 확립하고 국내 농산물 시장의 신뢰를 증진시켜 소비자의 소비를 촉진시키고 국가 경쟁력을 신장시킴으로서 경제 발전에 기여할 것임

붙임. 참고문헌

- Bal J, Yun S, Yeo S, Kim J, Kim D. Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter nuruk. *Food Microbiol* 2016;60:73-83.
- Bertrand B, Boulanger R, Dussert S, Ribeyre F, Berthiot L, Descroix F, Joët T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chem* 2012;135(4):2575-83.
- Bhute S, Pande P, Shetty SA, Shelar R, Mane S, Kumbhare SV, Gawali A, Makhani H, Navandar M, Dhotre D. Molecular characterization and meta-analysis of gut microbial communities illustrate enrichment of Prevotella and Megasphaera in Indian subjects. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:660.
- Bondia-Pons I, Savolainen O, Törrönen R, Martínez JA, Poutanen K, Hanhineva K. Metabolic profiling of goji berry extracts for discrimination of geographical origin by non-targeted liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Res Int* 2014;63:132-8.
- Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* 2006;20(8-10):341-51.
- Cheng H, Qin Z, Guo X, Hu X, Wu J. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Res Int* 2013;51(2):813-22.
- Choi DH, Kwon YM, Kwon KK, Kim S. Complete genome sequence of *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 T. *Standards in Genomic Sciences* 2015;10(1):107.
- Cramer AJ, Mattinson DS, Fellman JK, Baik B. Analysis of volatile compounds from various types of barley cultivars. *J Agric Food Chem* 2005;53(19):7526-31.
- Díaz R, Pozo OJ, Sancho JV, Hernández F. Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem* 2014;157:84-93.
- Díaz R, Pozo OJ, Sancho JV, Hernández F. Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem* 2014;157:84-93.
- Dinh H. Effect of System and Air Contaminants on PEMFC Performance and Durability (Presentation) 2010.
- El Sheikha AF, Durand N, Sarter S, Okullo JB, Montet D. Study of the microbial discrimination of fruits by PCR-DGGE: Application to the determination of the geographical origin of

physalis fruits from colombia, egypt, uganda and madagascar. *Food Control* 2012;24(1-2):57-63.

Feudo GL, Macchione B, Naccarato A, Sindona G, Tagarelli A. The volatile fraction profiling of fresh tomatoes and triple concentrate tomato pastes as parameter for the determination of geographical origin. *Food Res Int* 2011;44(3):781-8.

Fotakis C, Kokkotou K, Zoumpoulakis P, Zervou M. NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Res Int* 2013;54(1):1184-94.

Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res Int* 2013;50(1):55-63.

Grieshop CM, Fahey GC. Comparison of quality characteristics of soybeans from brazil, china, and the united states. *J Agric Food Chem* 2001;49(5):2669-73.

Hildebrand DF. Lipoxygenases. *Physiol Plantarum* 1989;76(2):249-53.

Ioset KN, Nyberg NT, Van Diermen D, Malnoe P, Hostettmann K, Shikov AN, Jaroszewski JW. Metabolic profiling of rhodiola rosea rhizomes by ¹H NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* 2011;22(2):158-65.

Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia JM, Romá J, Monfort P, Felipe V, Romero FJ. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2007;31(3):486-92.

Jung J, Philippot L, Park W. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports* 2016;6(1):1-10.

Jung JY, Lee SH, Jeon CO. Kimchi microflora: History, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98(6):2385-93.

Jung WY, Jung JY, Lee HJ, Jeon CO. Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of doenjang: A traditional korean fermented soybean paste. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:827.

Kim KA, Jung IH, Park SH, Ahn YT, Huh CS, Kim DH. Comparative analysis of the gut microbiota in people with different levels of ginsenoside Rb1 degradation to compound K. *PLoS One* 2013 Apr 29;8(4):e62409.

Buttigieg, P.L., Ramette, A. (2014). A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses, *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 543-550.

McDonald, D., et al. (2012) The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome, *GigaScience*, 1, 7.

- Hildebrand F, Tadeo R, Voigta A, Bork P, Raes J. (2014) LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. *Microbiome* 2: 37
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335–336.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(23): 7537–41.
- Wu, D., Doroud, L. and Eisen, J.A. (2013) TreeOTU: Operational Taxonomic Unit Classification Based on Phylogenetic Trees. ArXiv e-prints.
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C (2014) jVenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC bioinformatics* 15: 293.
- Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12: 385.
- Škuta C, Bartůněk P, Svozil D (2014) InChIlib—interactive cluster heatmap for web applications. *J Cheminform* 6:44.
- Vazquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. (2013) EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*. 2: 16.
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71: 8228–8235.
- Wang F, Men X, Zhang Ge, Liang K, Xin Y, Wang J, Li A, Zhang H, Liew H, Wu L. (2018) Assessment of 16S rRNA gene primers for studying bacterial community structure and function of aging flue-cured tobaccos.
- Gardes M, Bruns TD. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizas and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113–118.
- Buxdorf K, Rahat I, Levy M. (2013) *Pseudozyma aphidis* induces ethylene-independent resistance in plants. *Plant Signaling & Behavior* 8:11.
- Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc*, 2010; 5: 536–549.
- Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959; 37: 911–917.
- Bruun SW, Kohler A, Adt I, Sockalingum GD, Manfait M, Martens H, Correcting attenuated total reflection-fourier transform infrared spectra for water vapor and carbon dioxide. *Appl*

Spectrosc, 2006; 60: 1029–1039.

Kong J, Yu S, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007; 39: 549–559.

Murdock JN, Wetzel DL, FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Appl Spectrosc Rev*, 2009; 44: 335–361.

Deepashree CL, Kumar JK, Devi Prasad AG, Zarei M, Gopal S, FTIR spectroscopic studies on *Cleome gynandra*—comparative analysis of functional group before and after extraction. *Romanian J Biophys*, 2012; 22: 137–143.

Dashtban M, Kepka G, Seiboth B, Qin W, Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013; 169: 554–69.

Mecozzi M, Pietroletti M, Scarpiniti M, Acquistucci R, Conti ME, Monitoring of marine mucilage formation in Italian seas investigated by infrared spectroscopy and independent component analysis. *Environ Monit Assess*, 2012; 184: 6025–6036.

Duygu, DY, Udoh AU, Ozer TB, Akbulut A, Acikgoz I, Yildiz K, et al., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (turpin) kützing 1833. *Afr J Biotechnol*, 2012; 11: 3817–3824.

Lammers K, Arbuckle-Keil G, Dighton J, FT-IR study of the changes in carbohydrate chemistry of three New Jersey pine barrens leaf litters during simulated control burning. *Soil Biol Biochem*, 2009; 41: 340–347.

Gonzalez-Peña MM, Hale MDC, Rapid assessment of physical properties and chemical composition of thermally modified wood by mid-infrared spectroscopy. *Wood Sci Technol*, 2010; 45: 83–102.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.